







Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

## **NUEVOS REGULADORES EN LA POLARIZACIÓN ALTERNATIVA DE MACRÓFAGOS: p38 MAPK y ARF**

Memoria presentada por

**Lidia Jiménez García**

Licenciada en Farmacia, para optar al grado de Doctor

Directores

**Dra. Sonsoles Hortelano Blanco**

**Dr. Alfonso Luque Jiménez**





Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

## NUEVOS REGULADORES EN LA POLARIZACIÓN ALTERNATIVA DE MACRÓFAGOS: p38 MAPK y ARF

Memoria presentada por

**Lidia Jiménez García**

Licenciada en Farmacia, para optar al grado de Doctor

Directores

**Dra. Sonsoles Hortelano Blanco**

**Dr. Alfonso Luque Jiménez**

Unidad de Terapias Farmacológicas  
Instituto de Investigación de Enfermedades Raras  
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III





Dra. Sonsoles Hortelano Blanco, Científico Titular de OPIs del Instituto de Salud Carlos III  
y Dr. Alfonso Luque Jiménez, Investigador Miguel Servet en el Instituto de Salud Carlos III.

CERTIFICAN:

Que Lidia Jiménez García, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Granada, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado “Nuevos reguladores en la polarización alternativa de macrófagos: p38 MAPK y ARF” en la Unidad de Terapias Farmacológicas del Instituto de Investigación de Enfermedades Raras, que pertenece al Instituto de Salud Carlos III.

Revisado el presente trabajo consideramos que es apto y reúne los requisitos necesarios para poder optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para conste a todos los efectos, se extiende el presente certificado en Madrid, a 1 de Septiembre de 2016.

Fdo.: Sonsoles Hortelano Blanco  
Directora de tesis

Fdo.: Alfonso Luque Jiménez  
Codirector de tesis





El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en la Unidad de Terapias Farmacológicas del Instituto de Investigación de Enfermedades Raras, perteneciente al Instituto de Salud Carlos III, bajo la dirección de la Dra. Sonsoles Hortelano Blanco y el Dr. Alfonso Luque Jiménez, y con la ayuda predoctoral PFIS FI12/00340.



*Para investigar la verdad es preciso dudar, en cuanto sea posible, de todas las cosas.*

René Descartes (1596-1650)



*A mis padres y hermana*





# AGRADECIMIENTOS





# AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis. Sonsoles y Alfonso... gracias, mil gracias, un millón de gracias porque sin vosotros el camino no hubiera sido tan fácil, ni lo hubiera disfrutado tanto. Gracias por recibirme todas las mañanas con una sonrisa y despedirme todas las tardes con la misma sonrisa.

A Sonsoles quiero agradecer la gran oportunidad que me ha dado. Gracias por haberme acogido en tu laboratorio y haber confiado en mí. Formarme contigo ha sido un lujo, un privilegio y una suerte. Gracias por tener la puerta del despacho siempre abierta para todo lo que he necesitado, por mostrarte ilusionada con cada uno de los resultados que te he dado, por hacer que los problemas parezcan más pequeños y por enseñarme que si no está en mi mano de nada sirve preocuparse. Gracias por tus magdalenas.

A Alfonso quiero agradecer que haya sido el responsable de iniciarme en esto de la ciencia (allá por el 2009 en el CNIC) y lo peor de todo, de que me gustase en aquel momento y me siga gustando. Gracias por la paciencia que tuviste. Gracias por ser un pozo sin fondo de buen humor, por prestar tu ayuda siempre, por recibir con agrado cualquier sugerencia, por tu compañerismo, tus advertencias y consejos (te prometo que en alguno te haré caso). Gracias por los momentos con nieve carbónica.

Mis compañeras de laboratorio han sido angelitos caídos del cielo. Gracias Sandra por aguantarme todos los días (que con mis rarezas a veces no me aguanto ni yo), gracias por dejarme compartir contigo y gracias por compartir conmigo todas nuestras penas y alegrías que han sido muchas e intensas. Cuando no tenemos la familia cerca, nos hacemos con una segunda familia y te tocó formar parte de esta última. No has escatimado en palabras de apoyo y ánimo en mis momentos más bajos y tampoco en risas en momentos mejores. Gracias M<sup>a</sup> Angeles por llegar al labo en un momento crucial para mí... en la cuesta arriba. Tus ánimos han sido mágicos. Tu bondad es infinita. Ojalá hubieras llegado antes porque tienes mucho que ofrecer en lo personal y en lo profesional. Me quedé con ganas de más, de muchísimo más. Personas tan especiales como tú son escasas en la vida, y me siento afortunada por haber compartido un cachito de nuestro camino. No puedo olvidarme de los estudiantes de prácticas que me han

hecho reír hasta la saciedad. Gracias Adrián por cantarme todas las mañanas tus canciones chorras cuando me veías agobiada, gracias Vanesa por tu bondad, gracias Sandra junior por tu alegría contagiosa.

Hay mucha gente en el ISCIII a los que tengo que agradecer, y a muchos que ya no están. Gracias al laboratorio 117 al completo, los que están y no están (Flor, Carlos, Lauras, Patri, Leti, Bea, Sara, Ana, Gema...). Flor, mi compañera de viaje, gracias por hacerme sentir como en casa cuando llegué, y por estar ahí en momentos duros. Siempre nos quedará París. Carlos, eres un crack, gracias por tener respuestas y soluciones para todo. Laura un millón de gracias por tu saber escuchar. Sara, nos han faltado más meriendas y más fotos, pero un rato contigo siempre ha sido un placer. Al labo de Eva Cano: Andrés, Patri, Nando, Javi y Elena (Andrés, eres la bomba, Nando sin ti los calefactores de mi casa seguirían rotos y los inviernos hubieran sido muy fríos, Patri gracias por enseñarme y ayudarme siempre que lo he necesitado). Al labo de Javi Castro y todos los chicos que han pasado por ahí (Tere, Stefano, MA, Arantza, Esther, Vane, Montse, el acoplado de David Alfaro...), sólo ha habido buenos momentos buenos y muchas risas con vosotros, un millón de gracias porque sin vosotros nada hubiera sido igual. Gracias por prestarme vuestra ayuda siempre, por esas quedadas, que en mi opinión han sido escasas, pero siempre de calidad (dicen que lo bueno si breve dos veces bueno). Gracias a Marçal por su interés y su ayuda en tantas ocasiones y a sus chicas, Irmina y Malu (Irmina, mi otra compañera de viaje, hemos llegado al final. Gracias por todo). En definitiva, gracias a todos esos compañeros del pasillo que han hecho que los desayunos sean más dulces y las comidas más sabrosas.

También quiero agradecer a todas esas personas que nos facilitan el trabajo en el ISCIII. Gracias a Fernando y Silvia de confocal, bajar al microscopio era sinónimo de pasar un buen rato con vosotros aunque no me saliera el experimento. A Raquel de histología por todo lo que me ha enseñado. A los chicos del SPF, Dani, Cristina, María y Tere, porque sé que nos regaláis sonrisas ahí dentro aunque sólo nos veamos los ojos. Gracias a Encarna y a Juani. A las limpiadoras que me han animado la tarde con sus charlas (Fátima eres la mejor). A quién nos sirve el café que tanto necesitamos por las mañanas, María, Loli y Adri.

A gente fuera del ISCIII tengo que agradecer a Antonio Castrillo y sus chicos por acogerme unos días en su labo. Sobre todo quiero darle las gracias a Merci y a Irene. Merci, eres una gran persona. Irene eres una gran maestra.

A mis amigos. A esos que aunque esté a muchos kilómetros de distancia nunca me han abandonado, a esos que aunque yo haya desaparecido por temporadas siempre han estado

esperándome con los brazos abiertos, a esos que con paciencia escuchan todo lo que les tengo que contar cada vez que los veo. Gracias a mis Lauras, a Óscar, a Alfonsito y a María. Os quiero. Ojalá que en un futuro, estemos lejos o cerca, sigáis a mi lado porque os necesito.

A mi familia. Ángel no tengo palabras de agradecimiento suficientes, no hay muchas personas en el mundo como tú. A todos mis tíos y primos por todo lo que hemos disfrutado y lo que nos queda por disfrutar juntos. Tengo una colección sólo y exclusivamente de buenos momentos con vosotros. Os quiero. A mis abuelos y abuelas. He sido afortunada por disfrutaros tanto: he dormido con vosotros, he escuchado mil y un cuentos e historias, he tomado el fresco en el tranco de la puerta, he bailado para vosotros, y me habéis mirado con todo el amor que pueda existir. Quiero mencionar a mi abuelo Antoñín. Gracias abuelo porque nunca dudaste de mí, ni de mis posibilidades. Gracias por los platillos de gambas que nos comíamos todas las noches viendo tus cintas de video. Gracias por tu bondad y tu alegría.

A Jose por todo lo que un día fuimos y aprendimos juntos. Es imposible olvidar y tampoco quiero hacerlo. Gracias.

A mis padres se lo debo todo. Gracias por enseñarme el valor de las pequeñas cosas, el valor del trabajo bien hecho, el valor del respeto, de la humildad y la sinceridad. Gracias por apoyar cada una de las decisiones que he tomado en mi vida. Gracias porque sé, que pase lo que pase, siempre vais a estar conmigo y eso me tranquiliza.

Gracias a la persona que enciende la luz cuando mi vida se apaga, a mi mejor amiga, mi apoyo incondicional y mi gran amor, mi hermana.





# RESUMEN



# RESUMEN

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la activación alternativa de los macrófagos, con el objetivo de dilucidar nuevos mecanismos por los que estas células adquieren un fenotipo M2. La activación alternativa (M2) juega un papel fundamental en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos, tales como la inflamación, el cierre de heridas, el remodelado tisular, la progresión tumoral e infecciones parasitarias, así como en enfermedades respiratorias. Hemos identificado dos nuevos reguladores en este tipo de activación, la quinasa p38 MAPK y el supresor tumoral ARF. Además, hemos estudiado los mecanismos por los cuales estas proteínas regulan la polarización M2.

Nuestros resultados revelan que IL-4, además de activar STAT6 y PI3K, induce la fosforilación de p38 MAPK en macrófagos peritoneales de ratón. Además, la inactivación de p38 MAPK suprime la expresión de marcadores M2 tras la estimulación con IL-4, indicando que esta quinasa es fundamental en la polarización alternativa desencadenada por la señalización de IL-4.

También hemos demostrado que los macrófagos peritoneales ARF<sup>-/-</sup> muestran un fenotipo M2 exacerbado tras la estimulación con IL-4, posiblemente debido a una mayor activación y localización nuclear de STAT6. De acuerdo con los experimentos *in vitro*, los ratones deficientes en ARF exhiben un mayor fenotipo M2 *in vivo*, un modelo de polarización M2 inducido mediante la administración de quitina.

Finalmente, la relevancia fisiológica de ARF se ha confirmado al observar alteraciones asociadas a los macrófagos M2 en el pulmón de los animales ARF<sup>-/-</sup> y a través de la regulación del crecimiento de los tumores vía modulación del microambiente tumoral. De hecho, en el modelo de implante tumoral subcutáneo de células B16F10, el déficit en ARF no solamente favorece el crecimiento del tumor, sino que también aumenta la infiltración de macrófagos y la angiogénesis. El análisis de las poblaciones de macrófagos presentes en el tumor muestra un fenotipo similar al M2. Además, la interacción de las células tumorales con los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> induce una mayor migración de las células tumorales y la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2 más exacerbado.

En definitiva, hemos demostrado el papel que desempeñan las proteínas p38 MAPK y ARF en la polarización alternativa de macrófagos, consiguiendo así mejorar el conocimiento de la regulación de la respuesta inflamatoria.





# SUMMARY

In this work we have focused on the study of alternative polarization of macrophages, aiming to decipher new mechanisms involved in the activation of these cells towards a M2 phenotype. Alternative activated macrophages (M2) play an important role in a variety of physiological and pathological processes, including inflammation, wound repair, tissue remodeling, tumor progression, parasitic infection and respiratory pathologies. We have identified two new critical regulators of the alternative activation of macrophages: the p38 MAPK kinase and the tumor suppressor ARF. In addition, we have studied the mechanisms by which these proteins regulate M2 polarization.

Our results reveal that IL-4 induces phosphorylation of p38 MAPK in murine peritoneal macrophages, in addition to STAT6 and PI3K activation. Furthermore, p38 MAPK inactivation suppresses IL-4-induced typical M2 markers, indicating the involvement of p38 MAPK in the signaling of IL-4 leading to M2-macrophage polarization.

We have also demonstrated that ARF<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages show a M2 phenotype upon stimulation with IL-4 probably due to a more active and nuclear localization of STAT6. Consistent with the *in vitro* findings, mice deficient in ARF exhibit increase M2 phenotypes *in vivo* in a chitin-induced model of M2 polarization.

Finally, physiological relevance of ARF deficiency has been confirmed by the M2-mediated lung pathology observed in ARF<sup>-/-</sup> mice and the regulation of the tumor growth via modulation of tumor microenvironment. Indeed, in the tumor xenograft model, ARF deficiency not only enhances the growth of B16F10 tumors but also increases macrophage infiltration and angiogenesis. Analysis of macrophage population indicates that most of these cells showed a M2-like phenotype. In addition, tumor cell interaction with ARF<sup>-/-</sup> macrophages results in induction of tumor cell migration and skew ARF<sup>-/-</sup> macrophages to a more prone M2 phenotype.

In summary, we have demonstrated a novel role of p38 MAPK and ARF in the alternative activation of macrophages, which allows a better understanding in the modulation of the inflammatory response.





# I NDICE



ABREVIATURAS .....	37
INTRODUCCIÓN .....	43
<b>1. Sistema inmune .....</b>	<b>43</b>
1.1. Inmunidad innata o natural .....	43
1.2. Inmunidad adquirida o adaptativa .....	44
<b>2. Macrófagos y polarización .....</b>	<b>44</b>
2.1. Origen .....	44
2.2. Activación y polarización de macrófagos .....	46
2.2.1. Activación clásica o M1 .....	47
2.2.2. Activación alternativa o M2 .....	47
<b>3. Vías de señalización activadas por IL-4 .....</b>	<b>50</b>
3.1. Tipos de Receptores de IL-4 .....	50
3.2. Receptor de tipo I y sus principales rutas de señalización .....	51
3.2.1. Señalización mediante STAT6 .....	51
3.2.2. Señalización mediante IRS-2 y PI3K .....	52
3.3. Reguladores negativos de la ruta .....	52
<b>4. Nuevos reguladores en la polarización alternativa .....</b>	<b>53</b>
4.1. MAPKs: p38 MAPK .....	53
4.2. Genes de supresión tumoral: ARF .....	54
4.2.1. El locus INK4a/ARF .....	54
4.2.2. La proteína ARF .....	54
4.2.3. Funciones de ARF .....	55
<b>5. Desregulación en la polarización de macrófagos. Implicaciones y patologías asociadas .....</b>	<b>57</b>
5.1. Patologías asociadas a una polarización M1 .....	57
5.2. Patologías asociadas a una polarización M2 .....	58
5.3. Macrófagos asociados a tumores .....	59
OBJETIVOS .....	65

<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>69</b>
<b>1. Materiales y reactivos .....</b>	<b>69</b>
<b>2. Animales .....</b>	<b>70</b>
<b>3. Cultivos celulares .....</b>	<b>70</b>
3.1 Aislamiento y cultivo de macrófagos peritoneales de ratón .....	70
3.2 Obtención de macrófagos derivados de médula ósea.....	71
3.3 Aislamiento de poblaciones celulares derivadas del lavado broncoalveolar.....	72
3.4 Cultivo de líneas celulares.....	72
<b>4. Transfección con RNA de interferencia.....</b>	<b>72</b>
<b>5. Transfección con plásmidos .....</b>	<b>73</b>
<b>6. Aislamiento de RNA y PCR cuantitativa a tiempo real .....</b>	<b>73</b>
6.1 Aislamiento de RNA .....	73
6.2 Análisis de RNA mensajero mediante PCR cuantitativa a tiempo real .....	74
<b>7. Análisis de proteínas .....</b>	<b>76</b>
7.1 Preparación de extracto total de proteínas .....	76
7.2 Preparación de extracto citosólico y nuclear.....	76
7.3 Determinación de la concentración de proteínas.....	76
7.4 Inmunoprecipitación de proteínas.....	77
7.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot .....	77
7.6 Ensayo de actividad arginasa .....	79
7.7 Determinación de la síntesis de NO .....	80
<b>8. Determinación de marcadores de superficie por citometría de flujo .....</b>	<b>80</b>
<b>9. Inmunocitoquímica .....</b>	<b>81</b>
<b>10. Histología .....</b>	<b>81</b>
10.1 Inclusión de tejidos en OCT.....	81
10.2 Obtención de criosecciones .....	81
10.3 Tinciones .....	81
10.3.1 Hematoxilina-Eosina .....	81
10.3.2 Inmunofluorescencia.....	82
10.3.3 Inmunohistoquímica .....	82
<b>11. Ensayos de migración .....</b>	<b>83</b>
11.1 Ensayos de invasión .....	83
11.2 Ensayos de cierre de herida .....	83
<b>12. Ensayo MTT para determinar viabilidad celular .....</b>	<b>84</b>
<b>13. Modelos <i>in vivo</i> .....</b>	<b>85</b>
13.1 Implante subcutáneo de células tumorales B16F10 .....	85

13.2	Activación de macrófagos M2 <i>in vivo</i> .....	85
<b>14.</b>	<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>85</b>
<b>RESULTADOS .....</b>		<b>89</b>
<b>1.</b>	<b>Papel de p38 MAPK en la activación alternativa de macrófagos.....</b>	<b>89</b>
1.1	Caracterización del fenotipo de activación alternativa en macrófagos peritoneales tras la estimulación con IL-4.....	89
1.2	La señalización JAK-STAT6 está involucrada en la expresión de marcadores M2.....	91
1.3	La activación de p38 MAPK y PI3K es necesaria para la polarización alternativa de los macrófagos a través de IL-4.....	92
1.4	Las vías de señalización de STAT6 y PI3K dependen de la activación de p38 MAPK .....	96
1.5	JAK1 y JAK3 son capaces de activar a p38 MAPK.....	97
1.6	El silenciamiento de p38 MAPK suprime la expresión de marcadores M2 inducidos por IL-4 .....	98
1.7	La inhibición de p38 MAPK disminuye la polarización M2 <i>in vivo</i> .....	99
<b>2.</b>	<b>El Supresor de tumores ARF: Un nuevo regulador de la polarización de macrófagos .....</b>	<b>101</b>
2.1	La ausencia de ARF provoca una polarización M2 exacerbada en respuesta a IL-4 .....	101
2.2	Los macrófagos deficientes en ARF mantienen su plasticidad .....	103
2.3	Los macrófagos deficientes en ARF presentan mayor activación de STAT6.....	105
2.4	Los niveles de los receptores de IL-4 y la vía de JAK no se encuentran alterados en los macrófagos ARF-/-.....	106
2.5	Las rutas de PI3K y p38 MAPK, así como el regulador negativo SOCS1 no están implicados en la polarización M2 exacerbada de los macrófagos deficientes en ARF .....	109
2.6	STAT6 permanece más tiempo activo en el núcleo de los macrófagos deficientes en ARF tratados con IL-4.....	111
2.7	Los macrófagos ARF-/- también presentan mayor localización de C/EBP $\beta$ en el núcleo .....	111
2.8	Papel de ARF en la regulación del transporte citosol-núcleo: Sumoilación y/o formación de complejos .....	114
<b>3.</b>	<b>Relevancia fisiológica de ARF en modelos de activación M2 .....</b>	<b>119</b>
3.1	Animales deficientes en ARF presentan una polarización alternativa exacerbada en un modelo <i>in vivo</i> de polarización M2 inducido por quitina .....	119
3.2	Los macrófagos alveolares de los animales ARF-/- presentan una mayor polarización M2 ...	121
<b>4.</b>	<b>Papel de ARF en la regulación del desarrollo tumoral a través de la modulación de la polarización de macrófagos.....</b>	<b>123</b>
4.1	El déficit en ARF promueve el crecimiento tumoral y la infiltración de TAMs en un modelo de implante tumoral subcutáneo de células de melanoma B16F10 .....	123
4.2	El déficit de ARF promueve angiogénesis .....	126
4.3	El déficit de ARF modifica rutas moleculares que regulan la respuesta inmune tumoral y la angiogénesis. ....	129
4.4	Los macrófagos ARF-/- aumentan la capacidad de migración de células tumorales <i>in vitro</i> ..	131

4.5 Las células tumorales promueven la expresión de marcadores M2 relacionados con factores inmunosupresores en macrófagos .....	133
DISCUSIÓN .....	139
CONCLUSIONES .....	155
BIBLIOGRAFÍA .....	159
ANEXO .....	179







The background of the entire page is a microscopic image of cells, likely sperm, stained with a blue dye. The cells are numerous and scattered across the frame, showing their characteristic elongated shape and tails. A semi-transparent light orange horizontal band is positioned in the lower half of the image, serving as a backdrop for the title.

# ABREVIATURAS



# ABREVIATURAS

Las abreviaturas y acrónimos procedentes del inglés se han mantenido como tales

$\alpha$ -SMA	Actina alfa de músculo liso ( <i><math>\alpha</math>-Smooth Muscle Actin</i> )
ARF	Marco de lectura alternativo ( <i>Alternative Reading Frame</i> )
Arg1	Arginasa 1
BAL	Lavado broncoalveolar ( <i>Bronchoalveolar Lavage</i> )
BSA	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
BMDM	Macrófagos derivados de médula ósea ( <i>Bone Marrow Derived Macrophages</i> )
C/EBP $\beta$	Proteína $\beta$ de unión al amplificador CCAAT ( <i>CCAAT/Enhancer-Binding Protein <math>\beta</math></i> )
CSF1R	Receptor del factor estimulador de colonias -1 ( <i>Colony Stimulating Factor 1 Receptor</i> ). También se conoce como M-CSFR
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CRM-1	Región de mantenimiento cromosómica 1 ( <i>Chromosomal Region Maintenance1</i> )
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño ( <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> )
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares ( <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i> )
FBS	Suero fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
Fizz1	Encontrado en la zona inflamatoria 1 ( <i>Found in Inflammatory Zone 1</i> )
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ( <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )
HSCs	Células madre hematopoyéticas ( <i>Hematopoietic Stem Cells</i> )
IFN $\gamma$	Interferón $\gamma$ ( <i>Interferon <math>\gamma</math></i> )
IL	Interleuquina ( <i>Interleukin</i> )
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible ( <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> )
IRF4	Factor regulador de interferon 4 ( <i>Interferon Regulatory Factor 4</i> )
IRS	Sustrato del receptor de insulina ( <i>Insulin Receptor Substrate</i> )
JAK	Quinasa de Janus ( <i>Janus Kinase</i> )
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal ( <i>c-Jun N-Terminal Kinase</i> )
KLF4	Factor de transcripción de tipo Kruppel 4 ( <i>Kruppel-Like Factor 4</i> )

LMB	Leptomicina B ( <i>Leptomycin B</i> )
LPS	Lipopolisacárido ( <i>Lipopolysaccharide</i> )
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos ( <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> ). También conocido como CSF-1
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> )
MDM2	Doble minuto de ratón 2 ( <i>Murin Double Minute 2</i> )
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad II ( <i>Major Histocompatibility Complex II</i> )
MMP	Metaloproteinasa de la matriz ( <i>Matrix Metalloproteinase</i> )
MRC1	Receptor de manosa 1 ( <i>Manose Receptor, C-type 1</i> )
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero ( <i>Messenger RiboNucleic Acid</i> )
NEM	N-etilmaleimida
NK	Célula natural asesina ( <i>Natural Killer</i> )
NPM	Nucleofosmina ( <i>Nucleophosmin</i> )
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos ( <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> )
PBS	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
PBS-T	Tampón fosfato salino con Tween-20
PBS-Tx	Tampón fosfato salino con Tritón X-100
PFA	Paraformaldehído
PEI	Polietilenimina
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa ( <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i> )
PPAR $\gamma$	Receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma ( <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i> )
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones ( <i>Pattern Recognition Receptors</i> )
qPCR	Reacción de la cadena de la polimerasa cuantitativa ( <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> )
Rb	Retinoblastoma
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa inversa ( <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> )
siRNA	RNA de interferencia ( <i>Small Interfering RiboNucleic Acid</i> )
SOCS	Supresor de la señalización de citoquinas ( <i>Suppressor of Cytokine Signaling</i> )
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción ( <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> )
SUMO	Pequeño modificador parecido a la ubiquitina ( <i>Small Ubiquitin-like MOdifier</i> )
TAM	Macrófagos asociados a tumores ( <i>Tumor Associated Macrophages</i> )



TGM2	Transglutaminasa 2 ( <i>Transglutaminase 2</i> )
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta ( <i>Transforming Growth Factor Beta</i> )
Th	Linfocitos T colaboradores ( <i>T helper</i> )
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasas ( <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i> )
TLR	Receptor tipo Toll ( <i>Toll-Like Receptor</i> )
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> )
TYK	Tirosina quinasa 2 ( <i>Tyrosine Kinase 2</i> )
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
Ym1	También se conoce como quitinasa de tipo 3, Chil3 ( <i>Chitinase-Like 3</i> )
VE-Cadherin	Cadherina vascular endotelial ( <i>Vascular Endothelial Cadherin</i> )





The background of the entire page is a microscopic image of numerous cells, likely sperm or similar small cells, stained with a purple dye. The cells are scattered across the frame, with some showing distinct heads and long, thin tails. A semi-transparent horizontal band is positioned across the middle of the image, serving as a backdrop for the title.

# INTRODUCCIÓN



## 1. SISTEMA INMUNE

El sistema inmunitario comprende una compleja red de órganos, tejidos, células y moléculas, capaz de desarrollar mecanismos de defensa frente a cualquier agente exógeno o anómalo, con el objetivo de defender la integridad biológica del individuo. Una de las propiedades esenciales del sistema inmunitario es la capacidad de discriminación entre lo propio y lo extraño. Así, puede generarse una respuesta segura ante cualquier agente potencialmente dañino, sin ejercer un efecto perjudicial para las células y estructuras propias.

Los organismos poseen distintas líneas de defensa. En primer lugar existen barreras naturales o primarias como son la piel, el pH, las mucosas y la propia microbiota que evitan en gran medida el acceso de agentes patógenos. Si se sobrepasan estas barreras, el sistema inmunitario de los vertebrados cuenta con dos tipos de respuestas: una respuesta inmunitaria innata (o natural) y una respuesta inmunitaria adquirida (o adaptativa).

### 1.1. INMUNIDAD INNATA O NATURAL

La inmunidad innata proporciona una respuesta rápida ante cualquier patógeno que logra superar las barreras de los epitelios. Se considera una respuesta inespecífica en cuanto a que es incapaz de discriminar entre especies microbianas o celulares. Sin embargo, existen una serie de receptores denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) entre los que se encuentran los receptores de tipo Toll (TLRs) capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y señales endógenas asociadas a daño tisular (DAMP). La respuesta inmunitaria innata está mediada por diversos tipos de células como macrófagos, células dendríticas, granulocitos polimorfonucleares, mastocitos, células asesinas naturales (NK) y factores solubles (citoquinas y sistema del complemento). La inflamación es el principal mecanismo de respuesta de la inmunidad innata ante cualquier agente agresor, ya sea biológico (p.ej. patógenos o lesión tisular), físico (p.ej. radiaciones, temperatura o traumatismos) o químico (p.ej. toxinas). Además, la inmunidad innata está implicada en la

homeostasis de los tejidos y la eliminación de células anómalas, previniendo así el desarrollo tumoral.

## **1.2. INMUNIDAD ADQUIRIDA O ADAPTATIVA**

A diferencia de la inmunidad innata, la inmunidad adquirida genera respuestas altamente específicas debido al reconocimiento de estructuras moleculares propias de cada patógeno (antígenos) y no de un grupo de patógenos como ocurre con la inmunidad innata. En la primera exposición a un antígeno, la inmunidad adquirida desencadena una respuesta tardía y posterior a la respuesta inmunitaria innata. Sin embargo, en exposiciones sucesivas la respuesta que se desencadena es más rápida, robusta y duradera, a este hecho se le conoce como memoria inmunológica. La respuesta inmunitaria adquirida está mediada por componentes celulares (linfocitos T y B) y humorales (anticuerpos) que actúan de forma coordinada. La inmunidad innata es crucial para la activación de la inmunidad adquirida, principalmente por la capacidad de los macrófagos y células dendríticas de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T, que a su vez activan a los linfocitos B. Es por tanto necesaria una regulación y una coordinación muy precisa entre los dos tipos de inmunidad para asegurar la eliminación del patógeno sin dañar al propio organismo.

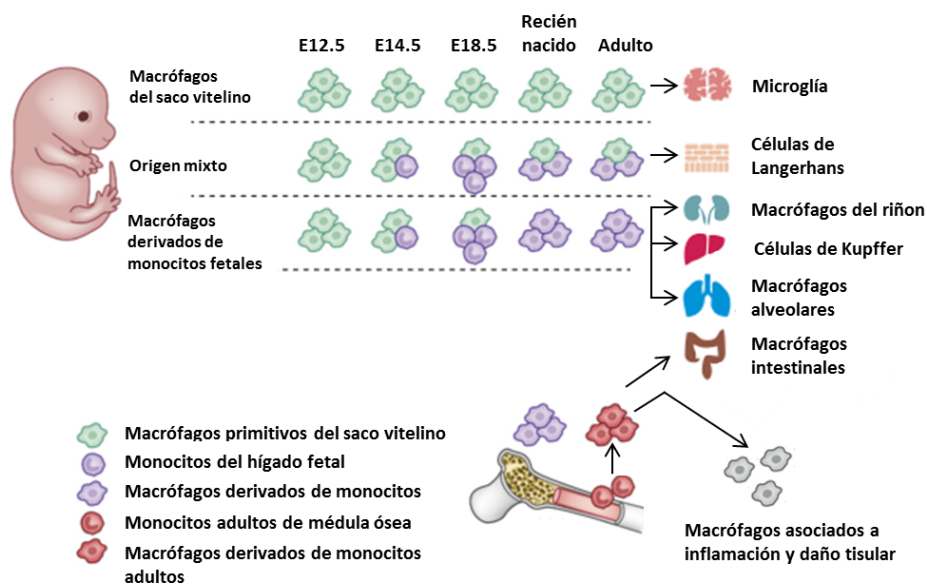
## **2. MACRÓFAGOS Y POLARIZACIÓN**

Un componente fundamental del sistema inmunitario innato son los macrófagos. Éstos son células mieloides especializadas en fagocitosis, función que fue descrita por Eli Metchnikoff a finales del siglo XIX [145]. Están presentes en la mayoría de los tejidos de los vertebrados y actúan como centinelas haciendo frente a cualquier patógeno o agente dañino que penetre en el organismo. Juegan un papel fundamental en la respuesta inflamatoria, tanto en su inicio como en su resolución, y son capaces de activar y regular la respuesta inmunitaria adaptativa [88, 94]. Más allá del papel inmunológico y de defensa que desempeñan, los macrófagos también intervienen en la homeostasis tisular y en la regulación del metabolismo [47, 163].

### **2.1. ORIGEN**

Tradicionalmente se ha considerado que los macrófagos son células completamente diferenciadas sin capacidad autoproliferativa; y que son los monocitos circulantes, procedentes de células madre hematopoyéticas de la médula ósea (HSCs), los que se extravasan a los tejidos y acaban diferenciándose a macrófagos [150]. Sin embargo, en la actualidad se ha establecido

un nuevo modelo que propone que los macrófagos tisulares tienen su origen en precursores embrionarios y no en monocitos sanguíneos, a excepción de algunas poblaciones de macrófagos tisulares [42, 78]. Mientras que algunas poblaciones de macrófagos tienen su origen y se renuevan a partir de monocitos sanguíneos que se reclutan a los tejidos como por ejemplo, los macrófagos del intestino, de la dermis, del corazón y aquellos asociados a inflamación y daño tisular; otras se mantienen de forma independiente a precursores hematopoyéticos circulantes gracias a su capacidad de autorenovación o por su longevidad, es el caso de las células de Langerhans (epidermis), las células de Kupffer (hígado), la microglía (cerebro), los macrófagos alveolares y los macrófagos de la pulpa roja del bazo (Fig.i.1) [78].



**Figura i.1. Representación de los distintos tipos de macrófagos según su origen y procedencia.** Los macrófagos de algunos tejidos derivan del saco vitelino (p.ej. microglía), otros derivan del hígado fetal (p.ej. macrófagos alveolares en el pulmón o células de Kupffer en el hígado), o pueden tener un origen mixto (p.ej. células de Langerhans en la piel). Además, otros macrófagos de origen embrionario pueden ser completamente reemplazados por monocitos adultos derivados de la médula ósea (p.ej. macrófagos intestinales o de la piel). Esos mismos monocitos adultos de médula ósea son los que se extravasan a los tejidos e inician la respuesta inflamatoria. Imagen modificada de Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ et al. *New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function*. Nat Immunol 2015.



En cuanto al origen embrionario de los macrófagos tisulares, los últimos estudios proponen que el saco vitelino, una estructura del desarrollo temprano del embrión, produce una primera oleada de progenitores eritromielodides independientes de c-Myb, los cuales colonizan el cerebro y otros tejidos fetales para dar lugar a unos macrófagos primitivos. Posteriormente, una segunda oleada de progenitores c-Myb<sup>+</sup> colonizan el hígado fetal. A partir de éstos se van a generar los monocitos fetales que irán remplazando los macrófagos primitivos procedentes del saco vitelino, y dando lugar a los macrófagos adultos presentes en la mayoría de tejidos (Fig.i.1) [43, 58, 59].

## 2.2. ACTIVACIÓN Y POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS

Los términos activación y polarización de los macrófagos hacen referencia a la capacidad que tienen estas células para responder a diferentes estímulos derivados de patógenos, daño tisular o activación de linfocitos; y a la reprogramación que sufren hacia un fenotipo que variará dependiendo del microambiente en el que esté situado el macrófago y del estímulo que reciba. Por lo tanto, dependiendo del estado de activación que adquieran, van a diferir en la expresión de receptores, producción de citoquinas y quimioquinas, y en sus funciones [133]. Aunque son muchos los estados de activación que pueden adquirir los macrófagos, tradicionalmente se han simplificado en dos estados de activación: clásica o M1 y activación alternativa o M2.

La activación clásica de los macrófagos, originalmente hacía referencia a macrófagos estimulados con interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) y posteriormente esta nomenclatura se extendió a aquellos estimulados a través de ligandos de receptores TLR como el lipopolisacárido (LPS), un componente de las membranas de bacterias Gram negativas [85]. La separación de los conceptos “activación clásica” y “activación alternativa” tiene su origen a principio de los 90, cuando Gordon y colaboradores plantearon que las interleuquinas 4 y 13 (IL-4 e IL-13 respectivamente) inducían en los macrófagos una activación alternativa con un fenotipo diferente al de la activación clásica [27, 138]. Posteriormente, Mills y colaboradores introdujeron la denominación de M1 y M2 [91], en referencia al paradigma establecido en 1986 por Mosmann y colaboradores sobre la existencia de dos tipos de linfocitos T colaboradores (Th) según las citoquinas que secretaban: los Th1 que secretaban IFN $\gamma$  y son importantes en la defensa frente a los microorganismos intracelulares y la inflamación; y los Th2 que secretaban IL-4, y que desempeñan una función clave en las reacciones alérgicas y en la defensa frente a parásitos [93].

En los últimos años, los estudios referentes a la polarización de macrófagos han crecido exponencialmente. Las diferentes nomenclaturas, descripciones de los estados de activación y marcadores, así como las diversas metodologías experimentales; hacen bastante difícil la comparación entre estudios y la posibilidad de traslación entre especies. En 2014 se publicó un trabajo resultado de un consorcio de los principales investigadores en este área, con el objetivo de consensuar y unificar estos conceptos, y dar a conocer aquellos parámetros experimentales que afectan al estado de activación de los macrófagos [97].

### 2.2.1. ACTIVACIÓN CLÁSICA O M1

Los macrófagos M1 se originan en respuesta a estímulos proinflamatorios como el IFN $\gamma$ ; citoquinas como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ); o productos bacterianos como el LPS de la pared de bacterias Gram negativas [88].

Funcionalmente, los macrófagos M1 se caracterizan por su alta capacidad fagocítica y citotóxica, encaminada a eliminar patógenos intracelulares. Son fundamentales en iniciar y mantener la reacción inflamatoria y en promover una respuesta inmune antitumoral. Producen citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 o IL-23, y moléculas efectoras como especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Además, tras su activación expresan mediadores inflamatorios como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), esencial en la síntesis de prostaglandinas, y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que participa en la síntesis de óxido nítrico. COX-2 e iNOS han sido utilizados tradicionalmente como marcadores en la activación M1 de los macrófagos. También liberan quimioquinas como CXCL10, CXCL9 y CXCL5, que favorecen el reclutamiento de células NK y linfocitos Th1. Estos macrófagos actúan como células presentadoras de antígeno y promueven la diferenciación de linfocitos T en Th1 (Fig.i.2) [86, 88, 94].

### 2.2.2. ACTIVACIÓN ALTERNATIVA O M2

Inicialmente, la activación alternativa de los macrófagos se definió como la que se producía en respuesta a citoquinas como IL-4 e IL-13. En la inmunidad innata, las principales fuentes de producción de estas citoquinas son células de tipo granulocítico como basófilos, mastocitos y eosinófilos, e incluso los mismos macrófagos. La inmunidad adquirida, a través de los linfocitos Th2, también es una fuente importante de producción de IL-4 e IL-13. Además, los epitelios y células tumorales también pueden producir estas citoquinas [46, 86, 94].

En los últimos años, la definición de activación M2 se ha ampliado a escenarios donde otras citoquinas son las protagonistas. Atendiendo a éstas, los macrófagos M2 se han subdividido en: M2a o activación alternativa, desencadenada por IL-4 e IL-13; M2b, un fenotipo que se activa por inmunocomplejos, LPS o IL-1 $\beta$ ; y M2c, que se activa por IL-10, por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) o glucocorticoides [88]. Sin embargo, esta clasificación sigue sin cubrir en su totalidad el espectro de señales que parecen estar implicadas en la activación M2, así como la presencia *in vivo* de poblaciones de macrófagos mixtas.

Parece estar claro que los macrófagos M2 juegan un papel fundamental en la resolución de la respuesta inflamatoria y en la reparación tisular [84]. Así, los macrófagos M2 adquieren un fenotipo antiinflamatorio al disminuir la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-23, IFN $\gamma$ , GM-CSF o especies reactivas de oxígeno; a la vez que aumenta la expresión de citoquinas antiinflamatorias como IL-10, y la producción de mediadores lipídicos (lipoxinas, resolvinas o protectinas) que promueven la resolución de la inflamación [84]. Además, el aumento de expresión de quimioquinas como CCL13, CCL17, CCL22 o CCL2, favorecen el reclutamiento de monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos Th2 [86]. Por otro lado, los macrófagos M2 también intervienen en la respuesta inmunitaria de tipo II, encargada de la eliminación de patógenos extracelulares (p.ej. helmintos) y de reacciones alérgicas; y se ha descrito que pueden favorecer la progresión tumoral [2, 132] y presentar funciones inmunomoduladoras, por ejemplo suprimiendo la respuesta inmunitaria de tipo I [86].

Junto a estas funciones, la activación M2 de los macrófagos induce vías de señalización, factores de transcripción y expresión de genes muy diferentes a los descritos en los macrófagos M1. Así un aumento en la expresión de arginasa 1 (Arg1), del receptor de manosa (MRC1) y de genes implicados en el remodelado tisular como la quitinasa Ym1 y la proteína encontrada en la zona inflamatoria Fizz1, se ha asociado con el fenotipo M2 fundamentalmente en modelos murinos [94, 112]. A continuación se desarrollan con más detalle cada uno de éstos marcadores M2.

**Arginasa 1.** La enzima arginasa 1 (Arg1) ha sido ampliamente utilizada como marcador de polarización M2 en modelos murinos. Esta enzima utiliza la arginina para producir ornitina, un precursor de poliaminas y colágeno que contribuye a la producción de la matriz extracelular, a la reparación tisular y al crecimiento celular. En la polarización M1, la arginina también puede ser utilizada por la iNOS para producir NO [49, 86, 88, 94].

**Ym1 y Fizz1.** Otros marcadores implicados en el remodelado tisular y asociados a la polarización M2 en modelos murinos son Ym1 y Fizz1 [94, 112]. Ym1 es una quitinasa que ha perdido la capacidad enzimática de hidrolizar la quitina, un polímero que se encuentra



en hongos, en el exosqueleto de artrópodos y también en helmintos. Mientras que Ym1 se ha relacionado con la capacidad de unir carbohidratos de la matriz extracelular [19, 100], Fizz1 parece promover que dicha matriz se deposite [80, 100].

**MRC1.** El receptor de manosa, es uno de los marcadores de macrófagos M2 conservado en humanos y ratón. Reconoce glicoproteínas de algunos patógenos (*Candida albicans*, *Leishmania* y algunas micobacterias) y está implicado en la endocitosis de algunos antígenos manosilados [86].

Otra función asociada directamente con los macrófagos M2 es la angiogénesis. Factores proangiogénicos como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); quimioquinas como CCL2 y CXCL8; y metaloproteinasas del tipo MMP-2, MMP-9 y MMP-13, van a favorecer la angiogénesis en el contexto tumoral así como en las lesiones tisulares [84, 102].

Recientemente, se han descrito una serie de genes que están conservados en humano y en ratón, y que también definen a los macrófagos M2. Entre ellos se encuentran: el factor 4 regulador del interferón (IRF4), el factor 4 de tipo Kruppel (KLF4), el supresor de la señalización de citoquinas 1 (SOCS1) y la transglutaminasa 2 (TGM2) [87]. De hecho, una de las principales dificultades en los estudios referentes a la polarización de macrófagos, es la identificación de marcadores M2 que sean comunes en las distintas especies y modelos experimentales; lo que unido a las diferentes nomenclaturas, descripciones de los estados de activación, así como las diversas metodologías experimentales; hacen compleja la comparación entre estudios y la posibilidad de traslación entre especies, a pesar de los recientes intentos de consensuar y unificar estos conceptos [97].

En definitiva, dada la complejidad de los estados de activación de los macrófagos, en esta tesis doctoral utilizaremos los términos polarización y activación como sinónimos, abordando el modelo de polarización M1/M2 desde el concepto de activación clásica (M1) y de activación alternativa (M2) en respuesta a IL-4, sin distinción entre los distintos estados de activación M2 (Fig.i.2).

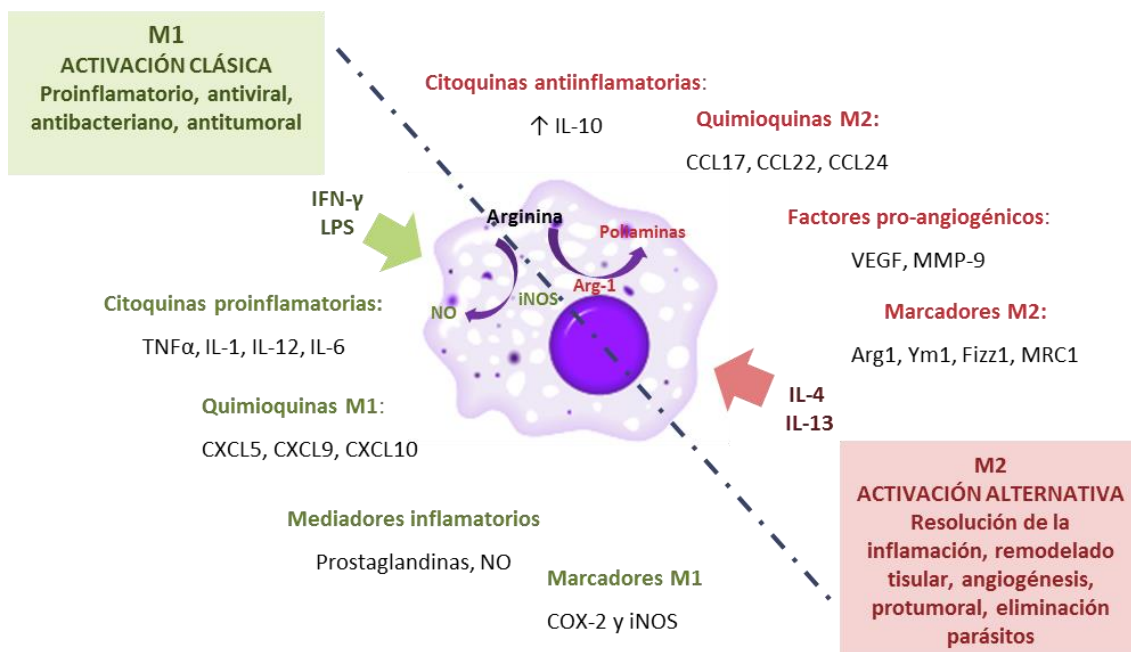


Figura i.2. Polarización de macrófagos M1 y M2. Fenotipo y funciones.

### 3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR IL-4

#### 3.1. TIPOS DE RECEPTORES DE IL-4

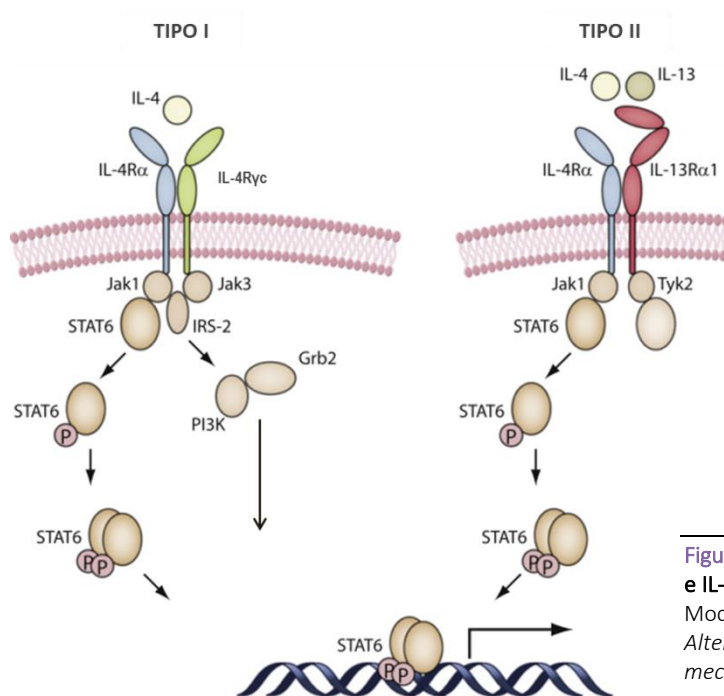
Existen dos tipos de receptores para IL-4, denominados de tipo I o tipo II (Fig.i.3). El receptor de tipo I está formado por la cadena  $\alpha$  (IL-4R $\alpha$ ), capaz de unirse a IL-4 con gran afinidad, y la cadena  $\gamma$  (IL-4R $\gamma$ ) común a otros receptores de citoquinas. El receptor de tipo I se encuentra principalmente en células hematopoyéticas, entre las que destacan los macrófagos. El receptor tipo II se encuentra en células no hematopoyéticas y está constituido por IL-4R $\alpha$  y por IL-13R $\alpha$ 1, una cadena de baja afinidad por IL-4 y que también forma parte del receptor de IL-13. IL-4 puede usar los dos tipos de receptores, mientras que IL-13 solamente puede utilizar los receptores de tipo II [72, 101]. Una vez que IL-4 se une a su receptor se produce la heterodimerización del mismo, activándose mediante auto o transfosforilación de tirosinas quinasas de la familia Janus (JAKs). IL-4R $\alpha$  se asocia con JAK1, IL-4R $\gamma$  está acoplado a JAK3 e IL-13R $\alpha$ 1 con la tirosina quinasa 2 (TYK2) y JAK2. Por lo tanto, JAK3 se activa exclusivamente por IL-4 a través del receptor de tipo I [72].

Las JAKs, una vez activas, son capaces de fosforilar a los residuos de tirosina del dominio citoplasmático de IL-4R $\alpha$ , que actúa como sitio de unión para moléculas de señalización [101]. El primer residuo de tirosina, Y1 interacciona con el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) en células no hematopoyéticas, o 2 (IRS-2) en células hematopoyéticas. A los residuos Y2-Y4 se une

el transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6), y por último, en el residuo Y5 se acoplan proteínas inhibidoras de la ruta como las fosfatasa SHP-1 y SHP-2 (del inglés, *Src-homology 2 domain (SH2)-containing PTPs*); y SHIP-1 (del inglés, *SH2 (Src homology 2)-containing inositol phosphatase-1*) [83].

### 3.2. RECEPTOR DE TIPO I Y SUS PRINCIPALES RUTAS DE SEÑALIZACIÓN

La unión de IL-4 al receptor de tipo I induce dos rutas de señalización principales: una ruta canónica mediada por el factor de transcripción STAT6 y otra ruta, iniciada por IRS-2 y por la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) (Fig.i.3) [101].



**Figura i.3.** Esquema de la señalización de IL-4 e IL-13 a través de los receptores de tipo I y II. Modificado de Gordon S, Martinez FO. *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity 2010.*

#### 3.2.1. SEÑALIZACIÓN MEDIANTE STAT6

STAT6 es un factor de transcripción que se encuentra latente en el citoplasma en su forma monomérica e inactiva. Tras la estimulación del receptor de IL-4, STAT6 es reclutado por los residuos de tirosina de IL-4Rα y se activa mediante fosforilación en la tirosina 641. STAT6 fosforilado y activo, es capaz de dimerizar y translocar al núcleo donde se unirá al promotor de sus genes diana (Fig.i.3)[101]. Se ha descrito que para que se produzca una activación constante de STAT6, es necesario un continuo reciclamiento de este factor de transcripción entre el núcleo y el citoplasma. De modo que una vez que STAT6 entra al núcleo en su forma activa y se une a los promotores de sus genes, es desfosforilado y sale al citoplasma en su forma

monomérica para ser activado de nuevo [3]. Además, estudios realizados en células Hela transfectadas con STAT6, indican que éste entra en el núcleo de manera continua, con un ratio similar antes y después de su fosforilación, y que su acumulación en el núcleo ocurre solamente cuando STAT6 está fosforilado y tiene la capacidad de unirse al DNA [20].

Además, STAT6 puede cooperar con otros factores de transcripción regulando la expresión de algunos genes. Es el caso de la proteína  $\beta$  de unión al amplificador CCAAT (C/EBP $\beta$ ), que junto con STAT6 pueden regular la transcripción de genes como Arg1 [103] o Fizz1 [139]. No obstante, a pesar de que STAT6 y C/EBP $\beta$  se unen a sitios muy próximos en los elementos de respuesta de estos genes, existe cierta controversia acerca de si ejercen un efecto sinérgico, o simplemente cooperan estabilizando su unión al DNA [49, 103, 128]. STAT6 también puede interaccionar con el receptor activado por proliferadores peroxisomales  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), en este caso mejorando la unión de PPAR $\gamma$  al DNA [141].

### 3.2.2. SEÑALIZACIÓN MEDIANTE IRS-2 Y PI3K

IRS-2 actúa como iniciador de la vía no canónica del receptor y para su activación necesita a IL-4R $\gamma$ c, que solamente se encuentra en el receptor de tipo I de IL-4. Como consecuencia, IRS-2 se activa exclusivamente por IL-4 y no por IL-13. Una vez activa, IRS-2 es capaz de activar a PI3K conduciendo en última instancia a potenciar la expresión de genes dependientes de STAT6 como son Arg1, Fizz1 e Ym1 (Fig.i.3)[55].

### 3.3. REGULADORES NEGATIVOS DE LA RUTA

En cuanto a los inhibidores de la ruta de IL-4, hay que destacar los supresores de la señalización de citoquinas (SOCS), que son proteínas de rápida inducción. Estas moléculas pueden actuar a distintos niveles: pueden inhibir directamente a las JAKs, unirse a IL-4R $\alpha$  interfiriendo en la unión de otras proteínas de la ruta, o promover la degradación de JAKs [83]. Se ha visto que IL-4 induce rápidamente la síntesis *de novo* de SOCS1 en macrófagos, y que ésta es dependiente de STAT6. Por lo tanto, SOCS1 desencadena una retroalimentación negativa que inhibe la expresión de genes dependientes de STAT6 [25, 158].

## 4. NUEVOS REGULADORES EN LA POLARIZACIÓN ALTERNATIVA

Junto a las vías clásicas de señalización previamente mencionadas, en los últimos años se ha descrito la participación de nuevos reguladores en los procesos de polarización de los macrófagos. Es el caso de algunos miembros de la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), así como de genes de supresión tumoral, que parecen desempeñar un papel importante en la regulación de la activación de estas células.

### 4.1. MAPKs: p38 MAPK

Las MAPKs son serina-treonina quinasas implicadas en la transducción de señales, y se activan por receptores de citoquinas u otros receptores tirosina quinasas. Esta familia de proteínas está constituida por tres grupos fundamentales de quinasas: la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) y la MAP quinasa p38 (p38 MAPK). Se ha descrito que IL-4 juega un papel fundamental en la señalización de MAPKs, y que parece depender del tipo celular [62]. Tanto IL-4 como IL-13 inducen la fosforilación de ERK y JNK en células de músculo liso en humanos [57, 92]; mientras que en células B y T murinas, JNK no se activa y p38 MAPK si lo hace [62].

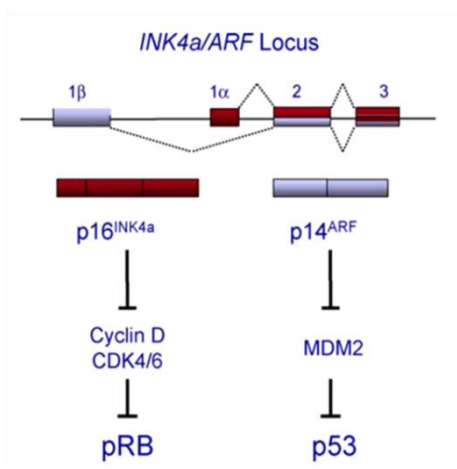
Centrándonos en los estudios referentes a p38 MAPK, esta quinasa parece activarse por IL-4 en células B, células T, células epiteliales, fibroblastos o células de carcinoma renal [62, 63, 74, 105, 157]. Sin embargo, existe cierta controversia acerca del papel de p38 MAPK en macrófagos. Algunos autores señalan que IL-4 es incapaz de activar p38 MAPK en macrófagos murinos y monocitos humanos [16, 62, 67], mientras que otros estudios describen su activación por IL-4 en la línea celular humana de monocitos THP-1 y en la línea celular de macrófagos murinos P388D1 [65, 125].

En cuanto a la regulación de la polarización alternativa de macrófagos a través de p38 MAPK, son escasos los estudios que se han realizado hasta el momento. Se ha descrito que la adenosina sola o en combinación con IL-4 aumenta la activación de p38 MAPK e induce la expresión de Arg1 [16]. Otro estudio más reciente demuestra que la inhibición de p38 MAPK disminuye los niveles de marcadores M2 como MRC1 y Arg1 en macrófagos deficientes de calcineurina [30]. Aunque en estos estudios se ha descrito la importancia de p38 MAPK en la expresión de algunos marcadores M2 en macrófagos, en ninguno de ellos se establece una relación directa entre IL-4, STAT6 y p38 MAPK.

## 4.2. GENES DE SUPRESIÓN TUMORAL: ARF

### 4.2.1. EL LOCUS INK4a/ARF

La proteína ARF es un producto derivado de un marco de lectura alternativo (de ahí las siglas en inglés ARF, *Alternative Reading Frame*), del locus INK4a/ARF, también llamado CDKN2A, que se encuentra en el cromosoma 9 en humanos y en el cromosoma 4 en ratón. Este locus codifica dos proteínas distintas, p16<sup>INK4a</sup> y ARF (p14<sup>ARF</sup> en humanos o p19<sup>ARF</sup> en ratón), que regulan la actividad de los supresores tumorales Rb (Retinoblastoma) y p53 respectivamente (Fig.i.4).



**Figura i.4. Esquema del locus INK4a/ARF.** Tomado de Sharpless NE. *INK4a/ARF: A multifunctional tumor suppressor locus. Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 2005.

p16<sup>INK4a</sup> y ARF comparten el exón 2 y 3 pero difieren en su primer exón. El exón 1α corresponde a p16<sup>INK4a</sup> y el exón 1β a ARF, cada uno con su promotor. Como consecuencia, la secuencia aminoacídica de ARF es totalmente distinta a la de p16<sup>INK4a</sup> generándose dos proteínas diferentes, cuya expresión va a ser regulada de forma independiente [111, 127]. El locus INK4a/ARF es fundamental para la defensa antitumoral, ya que sus dos productos p16<sup>INK4a</sup> y ARF, junto con Rb (retinoblastoma) y p53, son fundamentales en la regulación del ciclo celular; y la pérdida de función de cualquiera de ellos se ha relacionado directamente con el desarrollo tumoral [129] (Fig.i.4).

### 4.2.2. LA PROTEÍNA ARF

ARF está constituida por más de un 20% de residuos de arginina, con uno o ningún residuo de lisina (ratón y humano respectivamente). Es por lo tanto una proteína muy básica, sin estructura y muy inestable, que necesita formar complejos con otras moléculas para ser plegada y neutralizada a pH fisiológico [130]. Su localización nucleolar se debe precisamente a la formación de complejos entre ARF y nucleofosmina (NPM). Esos complejos permiten estabilizar a ARF, evitando que sea degradado rápidamente por el proteasoma [7]. Por lo tanto, no es de extrañar que se haya descrito que ARF puede interactuar con más de 25 proteínas distintas [36, 130]. De hecho, muchas de las funciones de ARF se le atribuyen por su capacidad de unirse a otras moléculas [130].

ARF no se expresa de forma detectable en la mayoría de los tejidos en condiciones normales. Su expresión se induce en tejidos envejecidos o en respuesta a señales hiperproliferativas anormales. De forma que, con la expresión de ARF y la consecuente activación de p53, se consigue parar el ciclo celular o conducir a la célula a apoptosis [129].

#### 4.2.3. FUNCIONES DE ARF

Una de las principales y primeras funciones que se describió para ARF es la de supresión tumoral. ARF ejerce esta función principalmente a través de la regulación de otro supresor tumoral, p53. ARF es capaz de secuestrar a MDM2, una ubiquitin ligasa que marca p53 para que sea degradado vía proteasoma. Esa interacción tiene como resultado la activación de programas que inducen apoptosis y la parada del ciclo celular, debido a la inhibición de la degradación de p53 y su consecuente activación [129]. Se han descrito funciones de ARF que son independientes de p53 y que han conferido a este supresor tumoral un papel más amplio como sensor frente a diferentes tipos de estrés [130, 154]. De hecho, se ha descrito un posible papel antiviral de ARF [37], así como su activación tras la expresión de proteínas virales o tratamientos con IFN de tipo I [117, 121]. Además, la inactivación de ARF se ha asociado con un agravamiento de la aterosclerosis debido a una menor apoptosis de macrófagos y células de músculo liso, los principales constituyentes de la placa aterosclerótica [44].

Nuestro grupo ha sido el primero en describir el papel de ARF en la regulación del sistema inmune innato y en la respuesta inflamatoria, así como en la activación y polarización de los macrófagos. El déficit en ARF confiere resistencia a shock endotóxico por LPS y los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> muestran una menor producción de mediadores proinflamatorios tras la activación por ligandos de los TLRs como TLR4; por ejemplo, baja expresión de citoquinas como IL-12, IL-6, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y también de los mediadores inflamatorios iNOS y COX-2 (Fig.i.5). Esa respuesta deficitaria no es exclusiva de la estimulación de TLR4, sino que también se ha descrito con la estimulación de TLR2, TLR3 y TLR9 por sus ligandos; y otras vías independientes de TLR como tioglicolato o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) [146].

Además, en estudios posteriores nuestro grupo demostró que el déficit en ARF se asocia con un cambio de fenotipo en los macrófagos, muy similar a una activación alternativa o M2. Así, en condiciones basales, los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> presentan un aumento en la expresión de algunos marcadores típicos M2 como son Ym1 y Fizz1; aunque es tras la estimulación con IL-4 cuando muestran un fenotipo M2 más marcado que los macrófagos WT. Junto a los típicos marcadores M2 (Ym1 y Fizz1), los niveles de citoquinas y quimioquinas como IL-10, CCL22, CCL5, CCR3 o CCR5 están sobreexpresados en los macrófagos ARF<sup>-/-</sup>. También hay que destacar

la mayor expresión de factores proangiogénicos relevantes como son VEGF y MMP-9, lo que sugiere que esos macrófagos también podrían ejercer un papel protumoral (Fig.i.5)[56].

Con respecto a los mecanismos por los cuales ARF regula la polarización de los macrófagos, se sabe que una menor activación del factor de transcripción nuclear NFκB es la causa de la disminución en la respuesta M1 [146]; sin embargo se desconoce el papel que desempeña ARF en la regulación de las vías de señalización implicadas en la activación M2. Este mecanismo ha sido objeto de estudio en esta tesis.

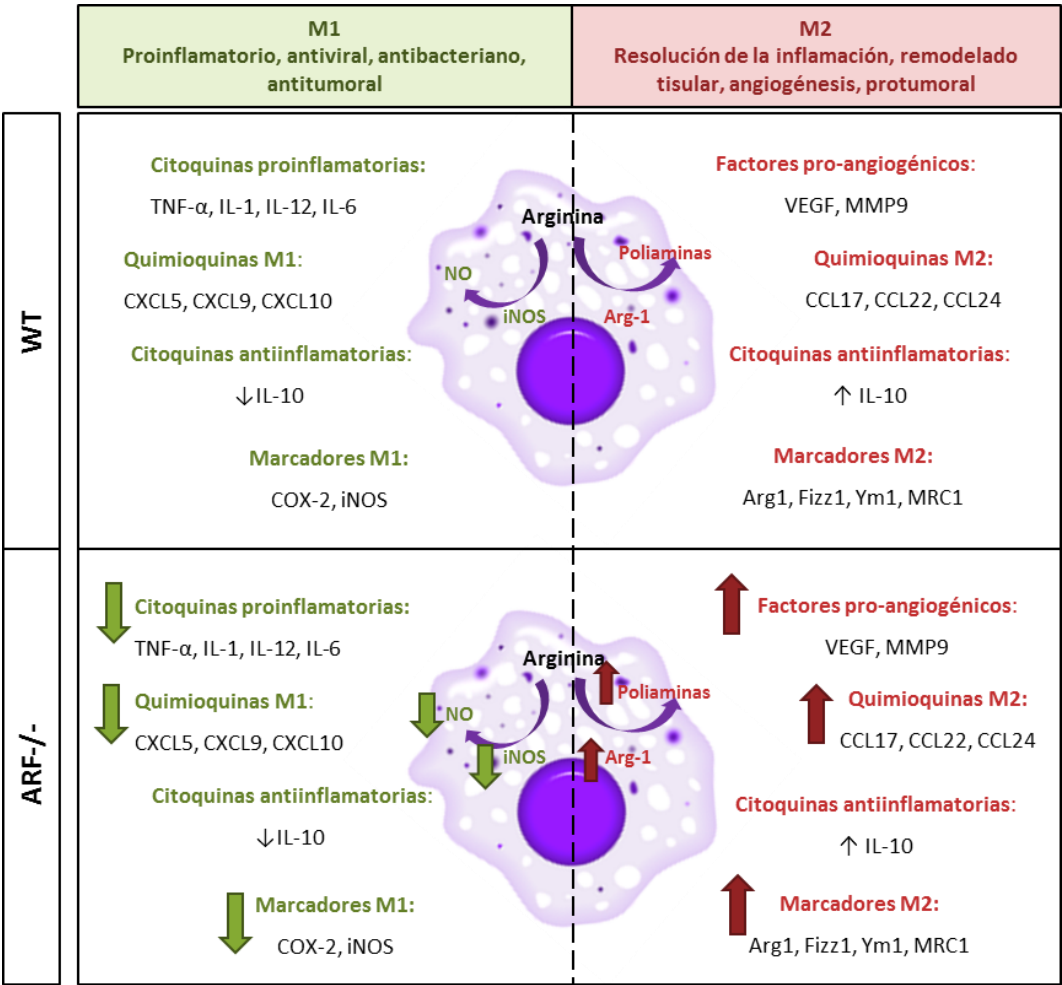
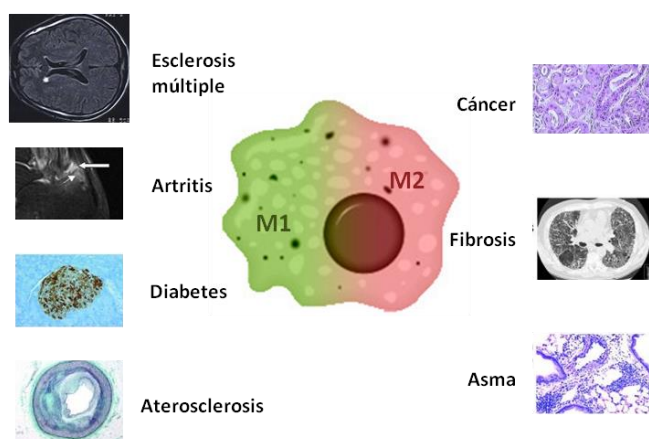


Figura i.5. Esquema de la polarización M1 y M2 en macrófagos WT y ARF<sup>-/-</sup>



## 5. DESREGULACIÓN EN LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS. IMPLICACIONES Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

Como hemos mencionado anteriormente, los macrófagos son células muy heterogéneas. Existen poblaciones de macrófagos que difieren en su origen y tienen funciones distintas dependiendo de su localización [78]. Además, pueden adquirir distintos estados de activación o polarización dependiendo de las señales del microambiente, lo que les confiere una enorme plasticidad. Por lo tanto, el balance entre los dos estados de activación (M1 y M2) ha de estar finamente regulado, ya que un fenotipo M1 o M2 exacerbado puede desembocar en el desarrollo de algunas patologías (Fig. i.6). El estudio de los mecanismos moleculares asociados a la plasticidad y polarización de los macrófagos, ha suscitado un interés enorme en los últimos años, ya que proporcionan nuevos horizontes en las estrategias terapéuticas y de diagnóstico de enfermedades donde los macrófagos desempeñan un papel fundamental en su patogénesis.



**Figura i.6.** Representación esquemática de patologías asociadas a estados de activación M1 o M2 exacerbados. Figura basada en Sica A, Mantovani A. *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas.* J Clin Invest 2012.

### 5.1. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A UNA POLARIZACIÓN M1

Existen diversas patologías, principalmente autoinmunes, relacionadas con procesos inflamatorios crónicos y que se han asociado a una activación M1 exacerbada de los macrófagos.

Enfermedades como la esclerosis múltiple, que cursa con lesiones desmielinizantes del sistema nervioso central; o la artritis reumatoide, caracterizada por una inflamación crónica de la membrana sinovial que acaba provocando la destrucción de la articulación, tienen como principales responsables de la patogénesis de la enfermedad a los macrófagos M1. En ambas enfermedades los macrófagos provocan una respuesta inflamatoria exacerbada, presentando

niveles elevados de citoquinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ ) que contribuyen al daño tisular y al agravamiento de la enfermedad [32, 45, 64]. En algunos casos se ha correlacionado un mayor infiltrado de macrófagos con un peor pronóstico [95]. Otras patologías como la obesidad y diabetes también son inflamaciones crónicas con un componente inmunológico importante. En las condiciones de hiperglucemia de la diabetes, las especies reactivas de oxígeno y la señalización M1 típica (IFN $\gamma$ /STAT1) están aumentadas [29, 75]. En la obesidad, los macrófagos asociados al tejido adiposo tienen un fenotipo fundamentalmente M1, produciendo citoquinas inflamatorias y aumentando la expresión de TNF $\alpha$  o iNOS. Aquí también se ha correlacionado el grado de infiltración de estos macrófagos y el grado de obesidad [155]. Por otro lado, se ha visto que el ejercicio y la pérdida de peso están relacionados con un cambio en el fenotipo de los macrófagos hacia una polarización M2, expresando marcadores típicos como son IL-10, Arg1 e Ym1 [71, 82].

## 5.2. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A UNA POLARIZACIÓN M2

Entre las patologías asociadas a una polarización M2 se encuentran enfermedades tan diversas como enfermedades respiratorias incluyendo los procesos alérgicos, el asma o la fibrosis pulmonar; o los procesos tumorales.

Los procesos alérgicos y el asma están desencadenados por una respuesta inmunitaria de tipo Th2 y se asocian con una polarización M2 de los macrófagos [90]. Se sabe que las citoquinas IL-4 e IL-13 están presentes de forma abundante en los pulmones de asmáticos, por lo que no es extraño que exista una mayor polarización alternativa de los macrófagos presentes en el pulmón y una mayor expresión de marcadores M2 [11, 90]. De hecho, se ha relacionado un mayor infiltrado de macrófagos M2 y una mayor expresión de marcadores M2, con una alergia más severa tanto en humanos como en ratón [23, 28, 73, 90]. Por ejemplo, en pacientes con asma se han encontrado niveles elevados de las quitinasas YKL-40 y AMCCase tanto en suero como en pulmón [23, 171]. Además, en biopsias bronquiales de personas asmáticas, existe un mayor número de macrófagos que expresan MRC1 y TGM2 comparados con pacientes sanos [87, 90].

La fibrosis pulmonar es una enfermedad progresiva e irreversible que se caracteriza por la destrucción de la arquitectura del pulmón y un exceso de depósitos de matriz extracelular. Se sabe que los macrófagos M2 juegan un papel importante en el desarrollo de la fibrosis, ya que un estado de activación M2 persistente no permite que se resuelva la enfermedad. Por ejemplo, Sun y colaboradores observaron que en ratones a los que se les inducía fibrosis mediante la sobreexpresión de IL-10, había un mayor número de macrófagos con activación

alternativa [140]. Además, modelos de fibrosis inducidos por bleomicina mostraron una sobreexpresión de Fizz1 inducida por IL-4 e IL-13, de forma dependiente de STAT6 [79]. Aunque en este estudio, la expresión de Fizz1 se detectó en neumocitos de tipo II y no se analizó lo que ocurría en la población de macrófagos, sí se había visto que en pacientes con fibrosis idiopática existe una mayor expresión MRC1 en macrófagos alveolares, así como una mayor producción de las quimioquinas CCL17 y CCL22, relacionadas con una activación alternativa de los macrófagos [104]. Además, en otros modelos de fibrosis en los que se han eliminado los macrófagos, se ha observado una disminución en los depósitos de matriz extracelular y también en los niveles de Arg1 e Ym1 [40]. Todos estos estudios indican que los macrófagos M2 juegan un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad.

### **5.3. MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMORES**

Los macrófagos asociados a tumores (TAMs) constituyen uno de los principales componentes de los infiltrados tumorales (hasta un 50%,) desempeñando un papel crucial en la progresión del tumor, hasta tal punto que se ha establecido una relación directa entre el grado de infiltración de TAMs y un peor pronóstico en algunos tumores [106]. Numerosas evidencias experimentales indican que los TAMs presentan fundamentalmente un fenotipo M2, mostrando muchas de las acciones protumorales características de este tipo de macrófagos. Por lo tanto, los TAMs son capaces de promover la supervivencia, proliferación y diseminación de las células tumorales [2].

Hay que tener en cuenta que en el microambiente tumoral existen cambios dinámicos desde las etapas iniciales del tumor a los estadios más avanzados, y que los macrófagos son células plásticas que se adaptan y se activan en función de las señales que reciban del entorno. Se ha visto que durante la progresión del tumor hay un cambio progresivo de la polarización de los macrófagos desde un estado M1 (actividad antitumoral) en las etapas iniciales, a un estado M2 (actividad protumoral) en las etapas más avanzadas, coincidente con la inhibición progresiva de NFκB (factor de transcripción implicado en la activación M1) y la adquisición de una activación alternativa debido a la ausencia de señales M1 [132].

El microambiente tumoral es capaz de liberar moléculas (p.ej. CCL2) capaces de atraer y reclutar a monocitos circulantes, los cuales se diferencian a macrófagos una vez que se encuentran en el tejido tumoral. La prevalencia del fenotipo M2 en los tumores se debe, no solo a la ausencia de señales M1 típicas como por ejemplo IFNγ o componentes bacterianos, sino también a la expresión de factores que favorecen una polarización alternativa. Por ejemplo, los linfocitos Th2 infiltrados en el tumor, al igual que las células tumorales, constituyen una fuente

importante de IL-4, principal inductor de la polarización alternativa de los macrófagos [136, 153].

Los TAM expresan niveles bajos del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II) y presentan una reducida actividad antitumoral, ejerciendo una acción inmunosupresora muy importante. Por un lado, por la elevada producción de IL-10, y por otro por la secreción de otras quimioquinas como CCL17 y CCL22 capaces de atraer principalmente a linfocitos Th2, los cuales se caracterizan por su baja capacidad citotóxica [136]. Los TAM presentan también niveles altos de genes específicos M2 tales como Arg1, Fizz1, MRC1 e Ym1 [9, 39], mientras que los niveles de mediadores citotóxicos como NO o IL-12 son bajos, debido a una menor activación de NFκB [132].

Los TAM contribuyen a la progresión del tumor al secretar factores proangiogénicos como VEGF, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGFβ). Además, producen proteasas (p.ej. MMP-9), que remodelan la matriz extracelular y rompen uniones intercelulares, procesos que son necesarios no sólo para la formación de nuevos vasos, sino también para favorecer la diseminación de las células tumorales [2, 136].

La actividad protumoral de los TAM hace de ellos unas células atractivas como nuevas dianas terapéuticas en cáncer. De hecho, en numerosos estudios en ratones en los que se han eliminado los macrófagos, se ha observado una disminución en el crecimiento del tumor, metástasis y angiogénesis [2, 35, 162, 168]. Otra aproximación terapéutica interesante sería re-educar a los macrófagos desde ese fenotipo M2 implicado en la progresión tumoral, hacia un fenotipo M1 con actividad antitumoral. Recientemente, estudios de Quail y colaboradores han descrito una disminución en la expresión de marcadores M2 en TAMs, y con ello una disminución en la progresión de gliomas tras la inhibición del receptor del factor estimulador de colonias 1 (CSF1R) [108]. Sin embargo, hasta el momento son pocos los estudios de agentes que permitan revertir el fenotipo de los TAMs, por lo tanto sería necesario seguir profundizando en el estudio de los mecanismos moleculares que ocurren en la transición de un estado de polarización a otro, con el objetivo de encontrar nuevas dianas terapéuticas.





The background of the slide is a dense, repeating pattern of microscopic cells, likely sperm, rendered in a light gray, semi-transparent style. These cells are distributed across the entire slide, with a higher concentration visible in the top and bottom sections. A solid light gray horizontal band runs across the middle of the slide, serving as a backdrop for the title text.

# OBJETIVOS





## OBJETIVOS

1. Caracterizar el papel de p38 MAPK en la polarización alternativa de los macrófagos.
2. Evaluar el papel de ARF en la polarización alternativa de los macrófagos.
3. Determinar la relevancia fisiológica de ARF en la polarización alternativa de macrófagos *in vivo*.
  - 3.1 Estudiar la polarización M2 en macrófagos deficientes en ARF en un modelo de activación alternativa *in vivo*.
  - 3.2 Analizar las poblaciones existentes en el lavado broncoalveolar de los animales ARF.
  - 3.3 Estudiar el microambiente tumoral en los animales deficientes en ARF.



A microscopic image showing a dense field of cells, likely fibroblasts, with elongated, spindle-shaped bodies and thin, branching processes. The cells are stained, showing a light green cytoplasm and darker green nuclei. They are distributed across the entire frame, with a slightly higher concentration in the center.

# **M**ATERIALES Y MÉTODOS



# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. MATERIALES Y REACTIVOS

- Los medios de cultivo DMEM y RPMI fueron suministrados por Lonza y el suero bovino fetal (FBS) por Sigma.
- El tioglicolato fue suministrado por BD Difco™.
- La interleuquina 4 (IL-4) fue adquirida en Peprotech y el lipopolisacárido (LPS) libre de endotoxinas de *Escherichia coli* en InvivoGen. La concentración de uso se indica en cada pie de figura.
- Los tratamientos farmacológicos fueron suministrados por distintas casas comerciales: El inhibidor general de JAKs (JAK-I) fue de Santa Cruz. El inhibidor específico de JAK-2 (AG490) y los inhibidores de p38 MAPK (SB202190 y SB203580) fueron de Sigma. El inhibidor de PI3K (LY294002) fue adquirido en Sigma y su control negativo (LY303511) en Abcam. Todos ellos fueron vehiculizados en DMSO de la casa comercial Sigma y la concentración de uso se indica en cada pie de figura. La leptomicina B (LMB), inhibidor de CRM-1, también fue suministrada por Sigma.
- El kit de siRNAs para p38 MAPK fue suministrado por Santa Cruz.
- La extracción de RNA se realizó con TRI Reagent® suministrado por Sigma.
- Para la retrotranscripción inversa (RT-PCR) se utilizó el kit SuperScript™ III adquirido en Invitrogen.
- Los materiales para la PCR cuantitativa (qPCR): placas ópticas de 96 pocillos, cubiertas adhesivas, cóctel *Fast SYBR Green PCR* fueron suministrados por Applied Biosystems.
- Los cebadores fueron sintetizados por Sigma.
- El cóctel de inhibidores de proteasas y la N-etilmaleimida (NEM) utilizados en la preparación del extracto total de proteínas fueron adquiridos en Sigma.
- El conjugado sefarosa/proteína G (Protein G Sepharose™) utilizado en la inmunoprecipitación de proteínas fue suministrado por GE Healthcare.
- La acrilamida para la preparación de los geles, así como las cubetas de electroforesis “Mini-PROTEAN III” fueron de Bio-Rad. Las membranas Hybond™-PVDF y el ECL para su revelado fueron suministrados por Amersham.

- Los anticuerpos fueron adquiridos en distintas casas comerciales. Ver [Tabla m.2](#).
- En las técnicas histológicas: el OCT para incluir los tejidos fue de Tissue-Tek® Sakura; la hematoxilina de Gill y la eosina fueron de Thermo; el xilol y el DPX fueron suministrados por Sigma; y los kits de ABC y DAB para inmunohistoquímica fueron de Vector.
- Los insertos de membrana semipermeable para los ensayos de migración fueron suministrados por Millipore.
- La quitina fue adquirida en Sigma.

## 2. ANIMALES

Todos los animales del estudio fueron tratados de acuerdo a los protocolos aprobados por el Órgano encargado del bienestar de los animales del centro (OEBA) y el Comité de ética de la investigación y bienestar animal del ISCIII (CElyBA), siempre en consonancia con la Normativa Europea. Los animales se mantuvieron en miniaisladores ventilados, con un estado sanitario libre de patógenos específicos y condiciones ambientales controladas (ciclos de 12 h de luz y oscuridad a 22°C). Se les administró una dieta estándar, permitiéndoseles el acceso *ad libitum* de agua y comida. La eutanasia de los animales se realizó mediante sobredosis de anestesia inhalada (isoflurano).

Los estudios se llevaron a cabo en ratones machos de 12 semanas de edad con fondo genético C57BL/6J. Los genotipos que se han utilizado en este estudio han sido:

- Wild Type (WT), cepa salvaje como control.
- *Cdkn2a*<sup>tm1Cjs</sup>, carentes de p19ARF (ARF<sup>-/-</sup>) [69].

## 3. CULTIVOS CELULARES

### 3.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN

Para inducir el reclutamiento de macrófagos a la cavidad peritoneal, se inyectaron intraperitonealmente 3 ml de tioglicolato (3% p/v) a cada animal. Transcurridos 4 días, los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de anestesia inhalada (isoflurano). Se retiró la piel de la zona abdominal y se inyectaron 10 ml de medio RPMI 1640 frío a cada animal. Tras realizar un masaje se recuperó el medio de la cavidad abdominal y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min. El pellet obtenido, compuesto fundamentalmente por macrófagos y linfocitos,

se resuspendió en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) y 50 µg/ml de penicilina/estreptomicina. Las células fueron sembradas en placas de cultivo y tras 4 horas a 37°C, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) para retirar las células no adheridas (principalmente linfocitos), y se añadió medio de cultivo fresco. Antes de los tratamientos, los macrófagos se mantuvieron durante 12 h en medio RPMI 1640 con 2% de FBS.

### 3.2 OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA

Para la obtención macrófagos derivados de médula ósea (BMDM). Se sacrificaron los animales con sobredosis de anestesia inhalada y se les seccionaron las patas traseras a la altura de la cadera. A estas patas se les retiró toda la piel y el músculo, dejando el tejido óseo limpio. Las patas se mantuvieron en DMEM complementado con 10% FBS y antibióticos hasta ser procesadas (nunca más de 1 h). Para extraer las células de médula ósea se seccionó el fémur y la tibia de cada extremidad. Se separaron de la rótula y se cortaron los extremos de ambos huesos. Con una jeringuilla de 10 ml y una aguja de 0,6 mm de diámetro se inyectó DMEM suplementado con 10% FBS en uno de los extremos haciendo pasar el líquido vigorosamente a través de la cavidad medular para recogerlo en un tubo de 50 ml con DMEM a 4°C. Este proceso se repitió hasta que el interior del hueso quedó limpio de médula. Una vez extraídas todas las células, se filtró el medio a través de filtro de 70 µm para eliminar posibles restos de tejidos. A continuación se centrifugó a 1200 rpm a 4°C durante 5 min y se incubó 2 min a 37°C en tampón de lisis de eritrocitos (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM disodio EDTA). Posteriormente se diluyó 10 veces en PBS, se centrifugó y se lavó dos veces con PBS resuspendiéndose las células en DMEM 10% FBS. Las células aisladas se sembraron en frascos de cultivo de 150 cm<sup>2</sup> (1 frasco por cada 4-5 patas) y se mantuvieron en las condiciones convencionales de cultivo a 37°C / 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda durante 24 h para favorecer la adhesión de fibroblastos, células maduras, etc. Tras este periodo se recuperó el medio de cultivo, que contiene las células no adheridas, se centrifugó y el precipitado, formado por células inmaduras de médula ósea, se resuspendió en un medio enriquecido que favorece la diferenciación de estas células a macrófagos [60]. Este medio está constituido por un 30% de sobrenadante procedente del cultivo de células L929 en DMEM 10% FBS y que se caracteriza por ser rico en factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) [152]. Las células se sembraron a una densidad de 10<sup>6</sup>/cm<sup>2</sup> y se mantuvieron en estas condiciones hasta que estuvieron completamente diferenciadas (7-8 días) constituyendo la fracción correspondiente a BMDM. Antes de realizar el tratamiento (12 h antes) se sustituyó el medio de diferenciación por DMEM 2% FBS para eliminar el M-CSF y sincronizar la división celular antes de aplicar los estímulos.



### 3.3 AISLAMIENTO DE POBLACIONES CELULARES DERIVADAS DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR

Los animales fueron sacrificados por inhalación con isoflurano. Se expuso la tráquea y se canuló con un catéter (BD Insite I.V Catheter 22 GA, BD). Se realizaron 4 lavados de 300 µl con PBS-EDTA 0,01 µM. El lavado broncoalveolar recuperado se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min para extraer mRNA del pellet resultante; o se realizó una citocentrifugación con 200 µl del BAL para posteriormente realizar una inmunocitoquímica (ver apartado 9 de materiales y métodos), o para realizar una tinción diferencial panóptica rápida (Panreac).

### 3.4 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares B16F10 y Hek293 se mantuvieron en cultivo en medio DMEM suplementado con 10% FBS y 50 µg/ml de penicilina/estreptomicina. La línea J774 se mantuvo en cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS y 50µg/ml de penicilina/estreptomicina. En todos los casos las células se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera con el 5% de CO<sub>2</sub>, realizándose controles rutinarios para comprobar que estaban exentas de contaminación por micoplasma.

## 4. TRANSFECCIÓN CON RNA DE INTERFERENCIA

La tecnología del siRNA (*small interfering RNA*) se basa en la inhibición de la traducción de un RNA mensajero (mRNA) debido a la unión de un RNA de interferencia complementario (siRNA). El resultado es una disminución de la expresión del gen que estaba transcrito en el mRNA.

Las células se transfectaron transitoriamente con siRNA para p38 MAPK. Para ello se utilizó un kit comercial de Santa Cruz siguiendo las recomendaciones del fabricante. El kit consiste en un cóctel de tres siRNAs específicos de p38 MAPKα de 19-25 nucleótidos (sc-29434), un siRNA control, siRNA control conjugado a FITC, un reactivo de transfección (sc-295228) que se usa en una proporción 1:1 (lípidos:siRNA) y un medio de transfección (sc-36868). La mezcla de transfección (siRNA y reactivo de transfección) se añadió a las células en el medio de transfección y se incubó a 37°C durante 6 h. Transcurrido ese tiempo se añadió 1 ml de medio de cultivo enriquecido al 20% FBS, sin quitar la mezcla de transfección. El cultivo se mantuvo otras 24h y posteriormente se evaluó la eficacia de la transfección con las células que fueron transfectadas con el siRNA conjugado a FITC. El porcentaje de células positivas se determinó mediante citometría de flujo. En estas condiciones experimentales no se observaron efectos citotóxicos.



## 5. TRANSFECCIÓN CON PLÁSMIDOS

Las transfecciones se realizaron en células Hek293 con un 60% de confluencia en placas de cultivo de 100 mm. Como reactivo de transfección se utilizó polietilenimina (PEI) a una concentración final de 10 µg/ml. Se preparó una mezcla con 100 µl de DMEM sin FBS, 10 µg de DNA totales y PEI (10 µg/ml). La mezcla se mantuvo 15 min a temperatura ambiente, se les añadió a las células y éstas se mantuvieron en condiciones normales de cultivo durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se cambió el medio y se mantuvieron 24h más en cultivo antes de realizar el experimento.

Como control se utilizó el vector vacío pcDNA3.1 cedido amablemente por el Dr. Marçal Vilar. La construcción para STAT6 clonada en pcDNA3.1 fue adquirida en GenScript. Las construcciones para SUMO1 y SUMO1m (SUMO1 mutado) fueron cedidas amablemente por el Dr. Pablo Gómez-del Arco. La construcción para p19ARF está clonada en pCMV6 y fue adquirida en OriGene.

## 6. AISLAMIENTO DE RNA Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

### 6.1 AISLAMIENTO DE RNA

El RNA total fue aislado y purificado a partir de células en cultivo o de tejidos de ratón. Las células o tejidos se lavaron con PBS frío y para su homogeneización se usó el reactivo TRI Reagent® de Sigma. Las células se homogeneizaron directamente desde la placa de cultivo y en el caso de los tejidos se utilizó el homogeneizador Heidolph RZR 2021. La muestra, una vez homogeneizada, estuvo 30 min en agitación suave a temperatura ambiente y posteriormente se añadió cloroformo frío en una proporción 1:5 respecto al volumen de TRI Reagent®. Se agitó vigorosamente 15 s y tras 3 min a temperatura ambiente, se centrifugó 15 min a 4°C y 11600 rpm. Para llevar a cabo la precipitación del RNA, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se añadió isopropanol en una proporción 1:2 respecto al volumen de TRI Reagent® y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se volvió a centrifugar 10 min a 11600 rpm y 4°C, el sobrenadante se decantó, lavándose el precipitado con una solución de etanol al 75% en agua estéril. Se centrifugó 5 min a 7250 rpm y 4°C y el precipitado final, una vez libre de etanol, se resuspendió en un volumen de agua estéril de entre 20-40 µl. Finalmente, para mejorar su disolución se incubó a 55°C durante 10 min. La cuantificación se llevó a cabo en un Nanodrop (ND-1000 *Spectrophotometer*, *Nanodrop Technologies*) y se comprobó su calidad según ratio A260/A280. El RNA se guardó a -80°C hasta su uso.

## 6.2 ANÁLISIS DE RNA MENSAJERO MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Para el análisis de mRNA, en primer lugar se realizó una transcripción inversa (RT-PCR) para generar DNA complementario (cDNA). Se trabajó con un rango de 100 a 500 ng de RNA purificado y se utilizó el kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al RNA se le añadió 1 µl de oligonucleótidos (“Random hexamers” 50 ng/µl) y 1 µl de cóctel de dNTPs (10 mM) y se llevó a un volumen final de 10 µl con agua estéril. La desnaturalización del RNA se llevó a cabo mediante la incubación de las muestras a 65°C durante 5 min. Posteriormente se mantuvo 1 min a 4°C, añadiéndose a continuación a cada muestra 10 µl del cóctel de síntesis de cDNA [2 µl tampón RT 10x, 4 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µl DTT 0.1 M, 1 µl RNaseOUT™ (40 u/µl) y 1 µl de la enzima retrotranscriptasa SuperScript™ III (200 u/µl)]. Las muestras se incubaron durante 10 min a 25°C, y posteriormente, durante 50 min a 50°C. La reacción se detuvo mediante calentamiento a 85°C durante 5 min. Finalmente, para eliminar posibles trazas de RNA que pudieran contaminar el cDNA, se les añadió 1 µl de RNasa H a cada una de las muestras y se mantuvieron a 37°C durante 20 min. Los cDNAs se conservaron a -80°C hasta su uso.

Una vez sintetizado el cDNA, se analizó la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando un termociclador *StepOnePlus™* de Applied Biosystems. La reacción se llevó a cabo en placas ópticas de 96 pocillos con cubiertas adhesivas. En cada pocillo de la placa se añadió: 2 µl de cDNA, 10 µl del cóctel *Fast SYBR® Green PCR* de Applied Biosystems, 250 nM de cada cebador (sentido y antisentido) para cada gen de estudio y 7 µl de agua ultrapura estéril. Las secuencias de los cebadores específicos usados en el presente trabajo se diseñaron utilizando el programa informático Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) y se pueden ver en la [Tabla m.1](#). Se corroboró la secuencia homóloga de hibridación de los cebadores para que fuesen únicas en el genoma murino mediante el uso de la herramienta informática BLAST (NCBI). Para cada gen realizamos la curva de disociación confirmando que nuestros cebadores eran realmente específicos y amplificaban una única secuencia. La cuantificación del mRNA se realizó mediante análisis comparativo ( $\Delta\Delta C_t$ ) con un gen de referencia cuya expresión no cambia con las distintas condiciones experimentales (*housekeeping gene*). En este trabajo se ha utilizado el gen 36B4 correspondiente a una de las subunidades ribosómicas.

**Tabla m.1. Cebadores para PCR cuantitativa**

Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')
36B4	AGATGCAGCAGATCCGCAT	GTTCTTGCCCATCAGCACC
Arg1	TGGCTTGCGAGACGTAGAC	GCTCAGGTGAATCGGCCTTTT
CCL17	TTGTGTTGCCTGTAGTGCATA	CAGGAAGTTGGTGAGCTGGTATA
CCL22	CATCATGGCTACCCTGCGTGTC	CCTCCTCCCTAGGACAGTTTATGGA
CCL5	TCTGTCAGCTGCCCTCACC	TCTGAACCCACTTCTTCTC
COX-2	TGGTGCCTGGTCTGATGATG3	GTGGTAACCGCTCAGGTGTTG
Endoglin	CTCGATAGCAGCACTGGATGAC	AGCTTCTGGCAAGCACAAGAA
Fizz1	CCATAGAGAGATTATCGTGGA	TGGTCGAGTCAACGAGTAAG
ICAM-1	CCGCTACCATCACCCTGTGA	GGCGGCTCAGTATCTCCTC
IL-10	CTGGACAACATACTGTAACCG	GGGCATCACTTCTACCAGGTAA
IL-13R $\alpha_1$	CATCTTCTCCTCAAAAATGGTGCC	GGATTATG ACTGCCACTGCGAC
IL-13R $\alpha_2$	CACACCTGGAGGACCCATTC	GTGGCAGACTCCCAGGAAATAT
IL-4R $\alpha$	ACCTGAGAACAGCGGAGGC	TCGGAAAACAGGTTCTCAGTGAG
IL-4R $\gamma$	GTGCAGTACCGGAGCAAC AGA	AAATGTGTACCGTTTCAGCTCATC
iNOS	TCCACAGTATGTGAGGATCAAAAA	ATGTGGCCTTGTGGTGAAGAGT
IRF4	TGTGCTCTGAACAAGAGCAAT	TATGAACCTGCTGGGCTGG
JAK1	GATAAGGAGTACTACACAGTCAAG	CAGACATCAGAGGCGATATAAA
JAK3	CTTGATGAGCCAAGTATCCTAC	TGCTCCTAGATACACAAATTC
KLF4	CGATGAACTGACCAGGCACTAC	CCTCTTCATGTGTAAGGCAAGGTG
MGL-2	AGCGGGAAGAGAAAAACAG	ACCAGTAGCAGGAGGCTGAG
MMP-2	GGACCTGGTACAGGAAGTCGA	AGCGGGTCATGGCTAACG
MMP-9	AAGGGTACAGCCTGTTCTGGT	CTGGATGCCGTCTATGTCGTCT
MRC1	GTAGTACCGGAGGGTGCAGA	TTTGCATCAGTGAAGGTGGA
PECAM-1	CGATGCGATGGTGTATAACG	TGTCACCTCCTTTTGTCCAG
p19ARF	CATGTTGTTGAGGCTAGAGAGG	TCGAATCTGCACCGTAGTTG
SOCS1	AGGATGGTAGCACGCAAC	GAAGACGAGGACGAGGAG
TGF $\beta$	CAACCCAGGTCCTTCCTAAA	GGAGAGCCCTGGATACCAAC
TGM2	GTGAGCCGTGCTATCTGTCCTG	ACTGCCTGCTTGGAACTGAA
TIMP-3	CACGGAAGCCTCTGAAAGTC	TCCCACCTCTCCACAAAGTT
VCAM-1	GGCTGAACACTTTTCCAGA	CCGATTTGAGCAATCGTTTT
VE-Cadherina	AGGACAGCAACTTCACCTCA	AACTGCCATACTTGACCGTG
VEGF	AGTCCCATGAAGTGATAAGTTCA	ATCCGCATGATCTGCATGG
VEGFR2	ACAGACCCGGCCAAACAA	TTCCCCCTGGAAATCCTC
Ym1	TGGAATTGGTGCCCTACAA	AACTTGCACTGTGTATATTG

## 7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 7.1 PREPARACIÓN DE EXTRACTO TOTAL DE PROTEÍNAS

Las células se lisaron durante 15 min a 4°C en tampón de extracto total (Chaps 0,5%, Tris 10 mM pH 7,5,  $MgCl_2$  1 mM, EGTA 1 mM, Glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5mM) al que se añadió de forma extemporánea 1 $\mu$ l/ml de un cóctel de inhibidores de proteasas (AEBSF 104 mM, aprotinina 80  $\mu$ M, bestatina 4 mM, E-64 1,4 mM, leupeptina 2 mM y pepstatina A 1,5 mM). Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante que se almacenó a -80°C. La concentración de proteína se determinó mediante el método del ácido becinconínico (BCA, Pierce <sup>TM</sup> BCA Protein Assay). En los experimentos en los que se quiso detectar sumoilación se utilizó buffer RIPA (20 mM Tris-HCl pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, Nonidet-P40 1%) y se complementó de forma extemporánea con 1 $\mu$ l/ml del cóctel de inhibidores de proteasas, 20 mM NEM (N-etilmaleimida, un inhibidor de proteasas de SUMO) y 0,1% SDS.

### 7.2 PREPARACIÓN DE EXTRACTO CITOSÓLICO Y NUCLEAR

Las células se lisaron en tampón H a 4°C (HEPES 10 mM pH 7,9, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, KCl 10 mM) al que se añadió extemporáneamente Nonidet P-40 0,5% y el cóctel de inhibidores de proteasas descrito en el apartado 7.1. Tras una incubación a 4°C durante 15 min se agitó vigorosamente durante 5 s. El lisado se centrifugó a 4°C y 13000 rpm durante 5 min. El sobrenadante (extracto citosólico) se recuperó y se almacenó a -80°C.

El precipitado, que constituye la parte nuclear, se resuspendió en tampón C frío (HEPES pH 7,9 20 mM, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol 20%) al que se añadió extemporáneamente el cóctel de inhibidores de proteasas. Los tubos se agitaron suavemente a 4°C durante 30 min, posteriormente se centrifugó a 13000 rpm y 4°C durante 5 min. El sobrenadante (extracto nuclear) se recuperó y se almacenó a -80°C.

### 7.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteína se determinó por el método del ácido becinconínico (BCA) con el kit de Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay: reactivo A (Carbonato sódico; bicarbonato sódico; ácido bicinconínico; tartrato sódico en hidróxido sódico 0,01 mM) y reactivo B (sulfato cúprico 4%). Este método combina la reacción de Biuret, en la que los enlaces peptídicos en un medio alcalino son capaces de reducir  $Cu^{+2}$  a  $Cu^{+}$ , con la formación de un complejo púrpura entre el BCA y el ión  $Cu^{+}$ . El complejo púrpura será más intenso cuanto más proteína haya en la muestra.

Este producto es soluble en agua y su absorbancia puede medirse a 562 nm [135, 160]. Se realizó una curva patrón con unos estándares de albúmina de suero bovino (BSA) de concentraciones conocidas, y a partir de ella se determinó la concentración de las muestras problema.

#### **7.4 INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS**

Se preparó un extracto total de proteínas (ver apartado 7.1) y se determinó su concentración (ver apartado 7.3). En primer lugar pre-incubamos el lisado celular con el conjugado sefarosa/proteína G (500 µl del extracto y 50 µl del conjugado) durante 1 h a 4°C en agitación. Se centrifugó a 1000 rpm durante 3 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se incubó durante la noche en agitación a 4°C con el anticuerpo primario (Tabla m.2). Al día siguiente, se le añadió 50 µl del conjugado sefarosa/proteína G y se incubó 2 h a 4°C en agitación. A continuación se centrifugó 1000 rpm durante 3 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y nos quedamos con el pellet formado por el complejo sefarosa/proteína G al que se habrá unido el complejo anticuerpo/proteína. El pellet se lavó tres veces con buffer de lisis-PBS en una proporción 1:10. Finalmente, el pellet se resuspendió en 40 µl de buffer de carga Laemmli (Tris-HCl pH 6,8 60 mM, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 3% y azul de bromofenol 0,005%) y se hirvió durante 5 min.

#### **7.5 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) Y WESTERN BLOT**

Las proteínas se separaron según su peso molecular mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes según el método descrito por Laemmli [77]. Los extractos de proteínas se calentaron a 95°C durante 5 min en el tampón Laemmli (Tris-HCl pH 6,8 60 mM, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 3% y azul de bromofenol 0,005%). Posteriormente, las muestras fueron cargadas en el gel y se realizó la electroforesis a temperatura ambiente en un tampón compuesto por glicina 1,25 M, Tris-HCL 12 mM y SDS 0,2%. Para la preparación de los geles se empleó acrilamida (Bio-Rad) con una proporción 29:1 de acrilamida: bisacrilamida y la electroforesis se llevó a cabo en las cubetas “Mini-PROTEAN III” (Bio-Rad)

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas Hybond™-PVDF (Amersham) a un amperaje constante de 350 mA durante 90 min, en un tampón de transferencia constituido por Tris-HCL 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%.

Tabla m.2. Anticuerpos

Anticuerpos primarios						
Anticuerpo	Especie	Proveedor	Referencia	WB	IHQ/IF	Citometría
Akt	conejo	Cell Signaling	#9272	1:1000		
Arginase I	conejo	Cell Signaling	#98190	1:1000		
C/EBP $\beta$	conejo	Santa Cruz	sc-150	1:500	1:50	
CD16/CD32	rata	BD Biosciences	553141			10 $\mu$ g/ $\mu$ l
CD31 (PECAM-1)	rata	BD Pharmigen	553370		1:50	
COX-2	ratón	BD Biosciences	610203	1:1000		
Fizz1 (RELM $\alpha$ )	conejo	abcam	ab93415	1:1000		
F4/80	rata	eBiosciences	14-4801-82		10 $\mu$ g/ $\mu$ l	
IL-4R $\alpha$	conejo	Santa Cruz	sc-686	1:500	1:50	
iNOS	conejo	BD Biosciences	610332	1:1000		
p19 ARF	rata	Santa Cruz	sc-32748	1:500	1:50	
p38 MAPK	conejo	Cell Signaling	#9212	1:1000		
Phospho p38	conejo	Cell Signaling	#9211	1:1000		
Phospho-Akt	conejo	Cell Signaling	#4058	1:1000		
Phospho-STAT6	conejo	Cell Signaling	#9361	1:1000		
Phospho-STAT6	ratón	Santa Cruz	sc-71793	1:500	1:25	
STAT6	ratón	Santa Cruz	sc-374021	1:500	1:50	
STAT6	conejo	Cell Signaling	#5397	1:1000		
SUMO1	conejo	Santa Cruz	sc-9060	1:500	1:50	
TIMP-3	conejo	Life technologies	710404	1:1000		
Ym1	conejo	Stem Cell	#01404	1:1000	1:50	
$\beta$ -actina	ratón	Sigma	A5441	1:10000		
Anticuerpos primarios marcados						
Anticuerpos	Especie	Proveedor	Referencia	Marcaje	IHQ/IF	Citometría
CD11b	ratón	BD Pharmigen	557672	AlexaFluor®488		10 $\mu$ g/ $\mu$ l
CD206	ratón	BioLegend	141710	AlexaFluor®488	10 $\mu$ g/ $\mu$ l	10 $\mu$ g/ $\mu$ l
F4/80	conejo	Abcam	ab105156	AlexaFluor®647	10 $\mu$ g/ $\mu$ l	10 $\mu$ g/ $\mu$ l
IL-4R $\alpha$	rata	BioLegend	144804	PE		10 $\mu$ g/ $\mu$ l
SiglecF	rata	BD Pharmigen	552126	PE		10 $\mu$ g/ $\mu$ l
Anticuerpos secundarios marcados						
Anticuerpos	Especie	Proveedor	Referencia	Marcaje	WB	IHQ/IF
anti-ratón	cabra	Jackson	115-095-006	FITC		1:50
anti-ratón	oveja	Healthcare	NXA931	HRP	1:10000	
anti-conejo	burro	Healthcare	NA934V	HRP	1:15000	
anti-conejo	cabra	Life Technologies	A11012	Alexa Fluor®594		10 $\mu$ g/ $\mu$ l
anti-conejo	cabra	Jackson	111-096-047	FITC		1:50
anti-rata	pollo	Life Technologies	A21471	Alexa Fluor®594		10 $\mu$ g/ $\mu$ l
anti-rata	cabra	Santacruz	sc-3823	HRP	1:5000	
anti-rata	cabra	Santacruz	sc-2041	Biotina	1:100	

A continuación, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos a las membranas, éstas se incubaron en agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente en una solución de bloqueo compuesta por BSA al 5% en PBS-T (PBS y Tween-20 0,1% p/v). Transcurrido este tiempo las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido (Tabla m.2) en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Al día siguiente se lavaron con PBS-T tres veces durante 10 min a temperatura ambiente, y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), preparado en la solución de bloqueo. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces durante 10 min con PBS-T a temperatura ambiente. Para detectar los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (Tabla m.2), las membranas se incubaron con el reactivo de quimioluminiscencia ECL Plus (Amersham), que se basa en la oxidación del luminol por acción de la peroxidasa, emitiendo luminiscencia que puede ser detectada por exposición en una película fotosensible o con el sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad). Para normalizar la cantidad de proteína cargada en los geles se utilizó el anticuerpo primario  $\beta$ -actina (41kDa).

La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó con el software Image J mediante el análisis digital de las imágenes obtenidas. Cada imagen de Western blot va acompañada de un gráfico de barras que muestra la cuantificación relativa de la proteína con respecto a la  $\beta$ -actina en unidades arbitrarias (u.a). Cada uno de estos gráficos muestra la media + DE de tres experimentos independientes.

## 7.6 ENSAYO DE ACTIVIDAD ARGINASA

Las células se lisaron con el tampón RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tritón-x100 1%, deoxicolato sódico 0,5%, SDS 0,1% y 1  $\mu$ l/ml del cóctel de inhibidores de proteasas) y se determinó la concentración de proteína con el método del BCA. La actividad arginasa del lisado se determinó de forma indirecta mediante la reacción colorimétrica descrita por Corraliza y colaboradores [14] basada en la hidrólisis del aminoácido L-arginina a urea por la enzima arginasa. La actividad arginasa de las muestras se comparó con la de estándares de urea de concentración conocida, que se prepararon realizando diluciones seriadas (entre 0 y 1500  $\mu$ g/ $\mu$ l) a partir de un stock de urea 8 M en Tris HCl 50mM pH 7,5. Para comenzar el ensayo se añadieron 50  $\mu$ l de Tris HCl, (50 mM, pH 7,5 con  $\text{MnCl}_2$  10 mM) a 50  $\mu$ l de las muestras y de los estándares. Para activar la enzima arginasa las muestras se calentaron durante 10 min a 55°C. Seguidamente, se añadieron 50  $\mu$ l de L-arginina (0,5 mM) y se incubaron a 37°C durante 1 h (en este paso tiene lugar la hidrólisis de la L-arginina a urea por la arginasa activa). Transcurrido ese tiempo la reacción se paró añadiendo 400  $\mu$ l de una mezcla ácida ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O} = 1/3/7$ ,

v/v/v). Para medir la cantidad de urea, en cada tubo se añadieron 25  $\mu$ l de  $\alpha$ -isonitrosopropiophenone al 9% en etanol absoluto y se incubó a 100°C durante 1 h. Posteriormente, las muestras permanecieron en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Por último se transfirieron 100  $\mu$ l de cada muestra y de los estándares de urea a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 540 nm con corrección a 690 nm. Se confeccionó una recta patrón con los estándares y se determinó la concentración de urea de las muestras una vez conocida su absorbancia. La actividad arginasa se expresó como urea producida ( $\mu$ g)/ proteína total ( $\mu$ g).

## 7.7 DETERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NO

La liberación de NO (acumulación de nitritos) fue determinada empleando el método de Griess [50]. Este método se basa en la reacción de los nitritos con el ácido sulfanílico, originando una sal de diazonio que se une al naftiletilenodiamina (NEDA), dando un complejo diazo. Este complejo diazo genera una coloración rosa, más intensa según sea mayor la cantidad de nitritos en el medio. La producción de NO se analizó en los sobrenadantes de cultivos celulares. A dichos sobrenadantes se adicionó ácido sulfanílico 1mM en HCl 100mM y NEDA 1mM. La absorbancia se determinó a 548 nm y se interpolaron los valores obtenidos en la correspondiente curva patrón de  $\text{NaNO}_2$ .

## 8. DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células en cultivo se levantaron con Tripsina-EDTA (Tripsina 0,25%, EDTA 5mM), se paró la reacción con medio de cultivo suplementado con 10% FBS, y a continuación se lavaron con medio de cultivo sin suero. Se utilizaron aproximadamente  $5 \times 10^5$  células por condición. En el caso de los macrófagos, en primer lugar se bloquearon los receptores Fc con anticuerpos contra CD16/CD32 (10  $\mu$ g/ml durante 30 min a 4°C) (Tabla m.2). Las células se lavaron 2 veces con medio sin suero y se incubaron con el anticuerpo primario a una concentración de 10  $\mu$ g/ml durante 30 min a 4°C (Tabla m.2). Tras dos lavados, las células se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a un fluorocromo, a una concentración de 10  $\mu$ g/ml durante 30 min a 4°C (Tabla m.2). En caso de utilizar anticuerpos primarios marcados directamente, éste último paso no fue necesario. Por último, las células se lavaron y resuspendieron en PBS en presencia de yoduro de propidio (0,001% p/v) para marcar y descartar las células muertas. La adquisición de las muestras se llevó a cabo en un citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi Biotec) y los datos se analizaron en el software MACSQuantify.



## 9. INMUNOCITOQUÍMICA

Las células se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos. Una vez finalizados los distintos tratamientos, las células se fijaron y permeabilizaron con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Se lavaron con PBS y se bloquearon en BSA al 1% en PBS durante una hora. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario durante una hora a temperatura ambiente (Tabla m.2), se volvieron a lavar con PBS y se incubaron 30 min más en oscuridad con el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia (Tabla m.2). Para finalizar los núcleos fueron teñidos con DAPI  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Life Technologies) durante 5 min. La preparación se lavó por última vez en agua destilada y se montó sobre el porta (Superfrost® plus, Thermo Scientific) con DABCO-Mowiol como medio de montaje. Las muestras fueron analizadas con el microscopio confocal Leica TCS SP5.

## 10. HISTOLOGÍA

### 10.1 INCLUSIÓN DE TEJIDOS EN OCT

Una vez extraído el órgano del animal se sumergió en OCT<sup>TM</sup> Compound (Tissue-Tek® Sakura), un polímero que solidifica a  $-20^{\circ}\text{C}$  y preserva la estructura del tejido, situado dentro de un molde desechable para histología. Inmediatamente se sumergió en isopentano frío rodeado de nieve carbónica, congelándose rápidamente.

### 10.2 OBTENCIÓN DE CRIOSECCIONES

Los tejidos conservados en OCT congelado se cortaron a  $5\mu\text{m}$  en un criostato (Leica CM 1950). Las secciones realizadas se recogieron en un portaobjetos (Superfrost® plus, Thermo Scientific) y se dejaron secar al aire durante 2 min antes de proceder a la tinción histológica o se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para conservarlos hasta su uso.

### 10.3 TINCIONES

#### 10.3.1 HEMATOXILINA-EOSINA

Esta tinción permite diferenciar distintas estructuras celulares y la morfología del tejido. La hematoxilina es un colorante de tipo básico que tiene afinidad por entidades de carácter ácido como por ejemplo los ácidos nucleicos, confiriendo al núcleo un color azul violáceo. La eosina es un colorante de tipo ácido que tiene afinidad por entidades de carácter básico como por ejemplo el citoplasma celular o componentes extracelulares a los que confiere un color rosado.

Las criosecciones dispuestas en los portas se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Tras lavar los portas con agua destilada, se realizó la primera tinción con hematoxilina de Gills durante 2 min y se aclararon con agua corriente. Posteriormente se tiñeron con eosina durante 1 min y se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (70°, 96° y 100°). Por último, los portas se sumergieron en xilol (Sigma) y fueron montados con DPX (Sigma).

### 10.3.2 INMUNOFLUORESCENCIA

Las criosecciones dispuestas en los portas se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Para permeabilizar el tejido, se utilizó el detergente Tritón X-100 al 0,1% en PBS, 10 min a temperatura ambiente. Tras la fijación y permeabilización, los tejidos se lavaron 3 veces con PBS-Tx (PBS-Tritón X-100 0,01 %) durante 5 min y se realizó el bloqueo de las muestras con BSA al 2% en PBS. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo-PBS, (ratio 1:1) (Tabla m.2). La incubación de los anticuerpos primarios se realizó en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Se lavó 3 veces con PBS-Tx durante 5 min y se incubó con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente (Tabla m.2). Se volvió a lavar y se incubó con DAPI 1µg/µl durante 5 min a temperatura ambiente. Se realizaron 3 últimos lavados de 5 min con PBS y un lavado con agua destilada y las muestras se montaron con DABCO-Mowiol. Las muestras fueron analizadas con el microscopio confocal Leica TCS SP5.

### 10.3.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

Al igual que en la inmunofluorescencia, la fijación del tejido se realiza con PFA 4 % durante 20 minutos. En primer lugar se bloquean las peroxidasas endógenas con una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 1 % durante 10 min. El bloqueo e incubación con el anticuerpo primario se realiza igual que la inmunofluorescencia descrita en el apartado 10.3.2. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavó con PBS-Tx y se incubó con un anticuerpo secundario biotinilado (Tabla m.2). La amplificación de la señal se realizó con el ABC-kit (Vectastain®) durante 30 min a temperatura ambiente y el revelado de la muestra con DAB (3,3'-diaminobezidina tetrahydrochloride). Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina de Mayer durante 2 min. Por último, el tejido se dejó secar y se montó con DPX. Las muestras fueron analizadas con el microscopio Carl Zeiss Primo Star.

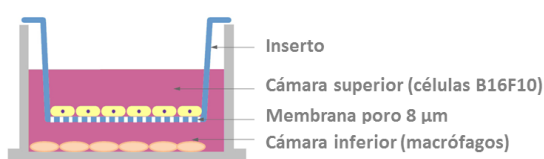
## 11. ENSAYOS DE MIGRACIÓN

La migración de células tumorales fue evaluada en sistemas de dos cámaras separadas por una membrana permeable, que dependiendo de su tamaño de poro dejará pasar a las células (tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$ ) o solamente dejará pasar citoquinas y factores solubles liberados por las células al medio de cultivo (tamaño de poro de 0,4  $\mu\text{m}$ ).

### 11.1 ENSAYOS DE INVASIÓN

En los ensayos de invasión, las células objeto de estudio se sembraron en la cámara superior, permitiendo la migración a través de la membrana permeable a la cámara inferior en respuesta a un gradiente quimiotáctico.

En nuestros estudios, en la cámara inferior se sembraron macrófagos WT o ARF<sup>-/-</sup>, o nada en el caso del control, y sobre cada pocillo se encajó un inserto que tiene una membrana permeable con un tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$ . El inserto constituye la cámara superior y sobre la membrana del mismo se sembraron las células tumorales B16F10 (Fig.m.1). Tras 24 horas, las células se fijaron con 4% de PFA en PBS y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0,5%. Las células que quedaron en la parte superior de la membrana (que no habían migrado), se eliminaron cuidadosamente con una torunda de algodón, quedando únicamente las células de la parte inferior de la membrana que sí habían migrado. La migración celular se cuantificó tras disolver la tinción en una solución de etanol 50% en 0,1 M de citrato sódico pH 4,2 y medir su absorbancia a 545 nm. Los valores de absorbancia más altos indican una mayor migración de las células tumorales a través de la membrana.



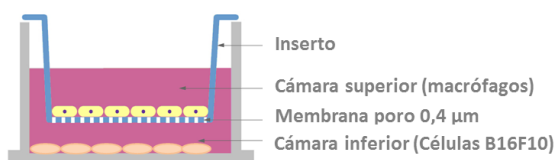
**Figura m.1. Esquema de los ensayos de invasión.** Dos cámaras separadas por una membrana porosa de 8  $\mu\text{m}$  que permite el paso de células desde la cámara superior a la cámara inferior. En la cámara superior se sembraron las células tumorales B16F10 y en la cámara inferior los macrófagos WT o ARF<sup>-/-</sup>.

### 11.2 ENSAYOS DE CIERRE DE HERIDA

Los ensayos de cierre de herida se realizaron también en sistemas de dos cámaras, utilizando en este caso una membrana de tamaño de poro de 0,4  $\mu\text{m}$  que solamente deja pasar las citoquinas y factores solubles liberados por las células.

Las células B16F10 se sembraron en la cámara inferior y se mantuvieron en cultivo hasta llegar a confluencia. Posteriormente se realizó una línea raspando con una punta de

pipeta la superficie de la placa recubierta por células. Tras la herida, la placa se lavó con PBS dos veces y se depositaron los insertos con un tamaño de poro de  $0,4\ \mu\text{m}$  con los macrófagos WT o ARF<sup>-/-</sup> previamente sembrados y adheridos (Fig.m.2).



**Figura m.2. Esquema del ensayo de cierre de herida.** Dos cámaras separadas por una membrana porosa de  $0,4\ \mu\text{m}$  que sólo permite el paso de factores solubles entre las dos cámaras. En la cámara inferior se sembraron las células tumorales B16F10 a las que se les hizo la herida cuando estuvieron en confluencia. Posteriormente se introdujo la cámara superior con los macrófagos WT o ARF<sup>-/-</sup> previamente sembrados y adheridos.

Se realizaron fotos a tiempo cero ( $t = 0\ \text{h}$ ) para determinar el área inicial de la herida y a 6 y 24h ( $t = \Delta\ \text{h}$ ) para evaluar el cierre de la misma. El área de la herida se cuantificó mediante Image J y la migración de las células se expresó en porcentaje de cierre de la herida:

**% de cierre de la herida** =  $[(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}) / A_{t=0h}] \times 100\%$ , donde  $A_{t=0h}$  es el área de la herida a tiempo cero, y  $A_{t=\Delta h}$  es el área que queda libre a las 6 y 24h después de hacer la herida.

## 12. ENSAYO MTT PARA DETERMINAR VIABILIDAD CELULAR

Las células B16F10 se sembraron en la cámara inferior. Una vez adheridas, se depositaron insertos con un tamaño de poro de  $0,4\ \mu\text{m}$  con macrófagos WT o ARF<sup>-/-</sup> previamente sembrados y adheridos. Tras 48 h de incubación se retiró el inserto con los macrófagos, se añadió el compuesto MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol] ( $2\ \text{mg/ml}$ ) a las células B16F10, y se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 h. Las células metabólicamente activas transformaron al MTT, mediante la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, en un compuesto hidrofóbico de color azul (formazán), el cual fue disuelto con DMSO y su absorbancia fue medida a  $540\ \text{nm}$ .

## 13. MODELOS IN VIVO

### 13.1 IMPLANTE SUBCUTÁNEO DE CÉLULAS TUMORALES B16F10

Las células tumorales B16F10 ( $3 \times 10^5$ ) fueron inyectadas en el flanco derecho de ratones WT y ARF<sup>-/-</sup>. Los animales se revisaron cada 2-3 días para monitorizar el crecimiento del tumor, signos de malestar y cambios de peso. Transcurridos 15 días de la inyección subcutánea, los ratones fueron sacrificados. Se aisló el tumor, se pesó y se determinó su volumen realizando medidas con un calibre Vernier:  $0,5 \times \text{largo} \times \text{ancho} \times \text{alto}$ .

### 13.2 ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS M2 *IN VIVO*

La administración de quitina, un componente del exosqueleto de los insectos, hongos y de parásitos como helmintos, provoca un reclutamiento local de eosinófilos y una activación de los macrófagos hacia un fenotipo M2 [66, 123]. En este estudio inyectamos intraperitonealmente 800 ng de quitina (Sigma-Aldrich). Transcurridos 2 días desde la inyección, los macrófagos peritoneales fueron recolectados mediante un lavado peritoneal y se determinó la expresión de marcadores M2 mediante qPCR y citometría de flujo.

## 14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de los resultados obtenidos en tres o más experimentos independientes. La significancia estadística entre dos grupos fue estimada mediante el test de la *t* de Student “no pareado”. Para comparar dos o más grupos se realizó un test ANOVA de una rama seguido de un test de Bonferroni. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando  $p < 0,05$ . Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa Prism5 (GraphPad Software).



A microscopic image of numerous sperm cells, showing their characteristic oval heads and long, thin tails, swimming in a light blue fluid. The cells are densely distributed across the frame.

# RESULTADOS





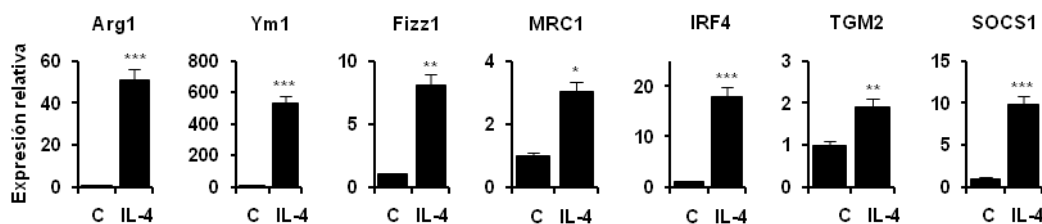


## 1. PAPEL DE P38 MAPK EN LA ACTIVACIÓN ALTERNATIVA DE MACRÓFAGOS

### 1.1 CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO DE ACTIVACIÓN ALTERNATIVA EN MACRÓFAGOS PERITONEALES TRAS LA ESTIMULACIÓN CON IL-4

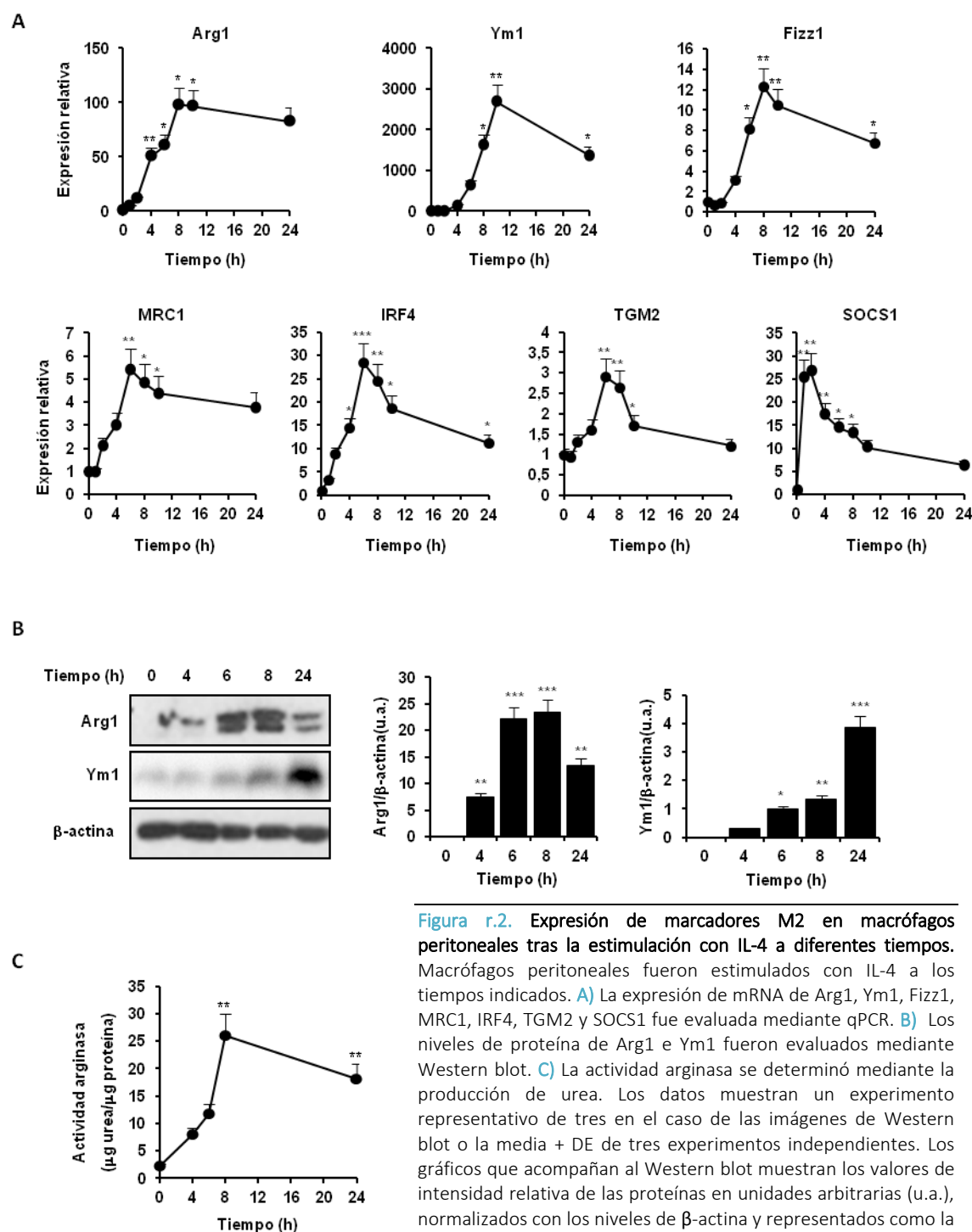
Con el objetivo de profundizar en el estudio del fenotipo de activación alternativa que adquieren los macrófagos peritoneales de ratón tras estimularlos con IL-4, examinamos los niveles de marcadores típicos M2 mediante qPCR. Como se ha comentado en la introducción, es difícil establecer un consenso acerca de los genes que deben ser considerados como marcadores de activación alternativa de macrófagos, debido a las diferencias existentes entre ratón y humano. Nosotros hemos evaluado la expresión de marcadores M2 tradicionales como son Arg1, Ym1 y Fizz1, pero que sólo se encuentran en ratón; y además hemos incluido un conjunto de genes entre los que se encuentran MRC1, IRF4, TGM2 y SOCS1; que han sido descritos recientemente como genes que, tras la estimulación con IL-4, aumentan su expresión tanto en ratón como en humano [87].

Tras el tratamiento de los macrófagos peritoneales con IL-4, observamos que los niveles de mRNA de Arg1, Ym1, Fizz1, MRC1, IRF4, TGM2 y SOCS1 aumentaron significativamente (Fig. r.1), confirmando que el panel de genes utilizado correspondía a un estado de activación alternativa. Un análisis más detallado de los niveles de expresión tras estimulación con IL-4 a distintos tiempos, demostró que la activación de los marcadores M2 era dependiente del tiempo, con un máximo de activación para todos ellos entre las 6 y 12 h de tratamiento (Fig.r.2A).



**Figura r.1.** Expresión de marcadores M2 en macrófagos peritoneales tras la estimulación con IL-4. Macrófagos peritoneales de ratones C57BL/6J fueron estimulados con IL-4 durante 6 h. La expresión de mRNA de Arg1, Ym1, Fizz1, MRC1, IRF4, TGM2 y SOCS1 fue evaluada mediante qPCR. Se muestra la media + DE de tres experimentos independientes. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , y \*\*\* $P < 0,001$  con respecto a la condición control (C).

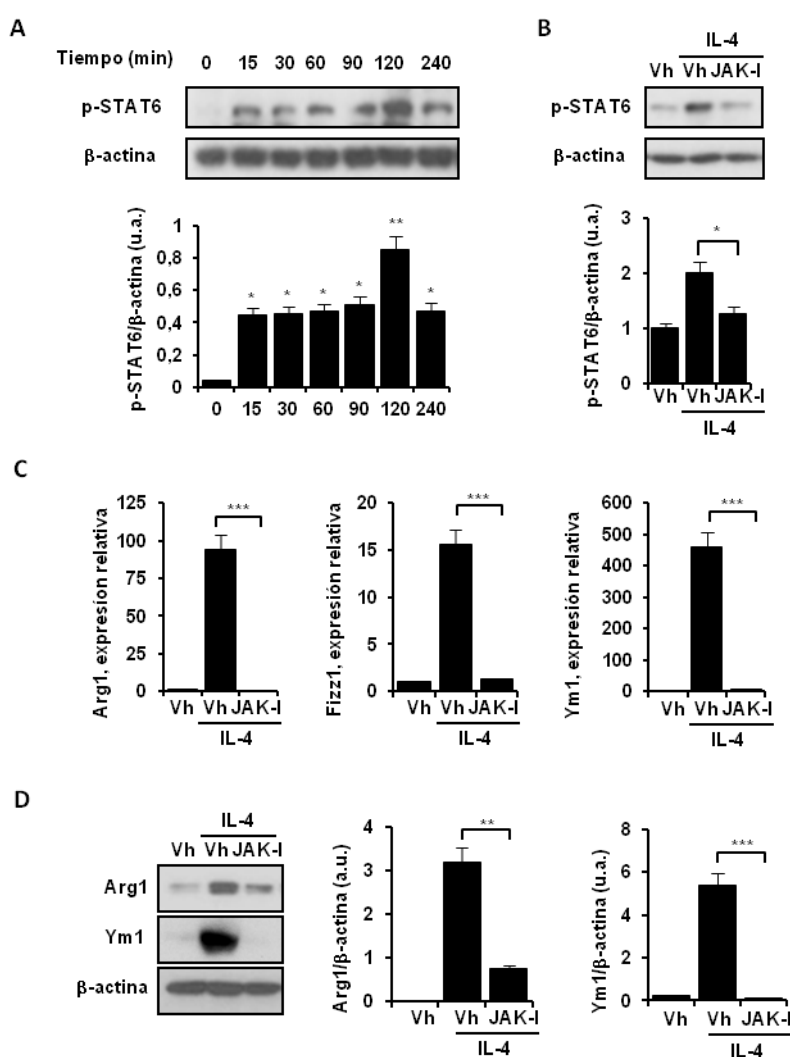
Posteriormente, analizamos los niveles proteicos de Arg1 e Ym1 mediante Western blot, observando que Arg1 ya era detectable a las 4 h, presentando un máximo de expresión entre las 6 y 8 h tras la estimulación con IL-4; mientras que los niveles de Ym1 no comenzábamos a detectarlos hasta las 6 h, coincidiendo con el patrón temporal de expresión del mRNA (Fig.r.2B). También se evaluó la actividad enzimática de Arg1 mediante la producción de urea, y observamos que el incremento de su actividad coincidía con los niveles de proteína de la enzima (Fig.r.2C).



**Figura r.2.** Expresión de marcadores M2 en macrófagos peritoneales tras la estimulación con IL-4 a diferentes tiempos. Macrófagos peritoneales fueron estimulados con IL-4 a los tiempos indicados. **A)** La expresión de mRNA de Arg1, Ym1, Fizz1, MRC1, IRF4, TGM2 y SOCS1 fue evaluada mediante qPCR. **B)** Los niveles de proteína de Arg1 e Ym1 fueron evaluados mediante Western blot. **C)** La actividad arginasa se determinó mediante la producción de urea. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot o la media + DE de tres experimentos independientes. Los gráficos que acompañan al Western blot muestran los valores de intensidad relativa de las proteínas en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de  $\beta$ -actina y representados como la media + DE (n=3). \*P<0,05, \*\*P<0,01, y \*\*\*P<0,001 con respecto a la condición control (0h).

## 1.2 LA SEÑALIZACIÓN JAK-STAT6 ESTÁ INVOLUCRADA EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES M2

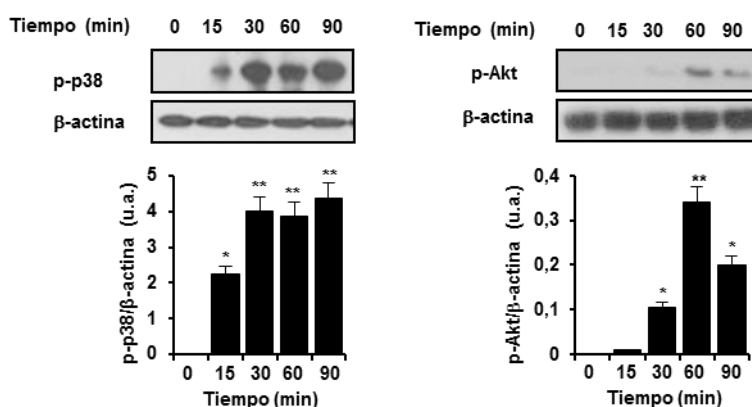
Como ya se ha descrito, STAT6 juega un papel clave en la polarización alternativa de los macrófagos. STAT6 se activa mediante fosforilación por tirosinas quinasas (JAKs) acopladas al receptor de IL-4. Además, la expresión de muchos marcadores de polarización alternativa depende de la activación de STAT6 [103, 133]. Nosotros pudimos comprobar que tras estimular los macrófagos peritoneales con IL-4, se producía un incremento de los niveles de fosforilación de STAT6 (Fig.r.3A). Para constatar el papel de la señalización de JAK-STAT6 en la expresión de marcadores M2, tratamos las células con un inhibidor general de JAKs (JAK-I) previa estimulación con IL-4. El tratamiento con JAK-I inhibió por completo la fosforilación de STAT6 (Fig.r.3B), así como los niveles de expresión de mRNA de Arg1, Ym1 y Fizz1, y los niveles de proteína de Arg1 e Ym1 (Fig.r.3C-D). Estos resultados confirman la relevancia de la ruta JAK-STAT6 en la expresión de marcadores M2 en macrófagos peritoneales.



**Figura r.3.** La ruta de señalización JAK-STAT6 está involucrada en la expresión de genes M2, tras la estimulación con IL-4 **A)** Macrófagos peritoneales se estimularon con IL-4 (20 ng/ml) durante los tiempos indicados o **B)** se trataron con el inhibidor de JAK (JAK-I, 1  $\mu$ M) durante 30 min, seguido de IL-4 durante 60 min. Se analizó el nivel de fosforilación de STAT6 (p-STAT6) mediante Western blot. **C-D)** Los macrófagos se trataron con JAK-I (1  $\mu$ M) durante 30 min, estimulándose posteriormente con IL-4 durante 8 h en C) y 24h en D). La expresión de mRNA de los marcadores M2, Arg1, Fizz1 e Ym1, se evaluó mediante qPCR (C). Los niveles de proteína de Arg1 e Ym1 se determinaron mediante Western blot (D). En B-D se utilizó como control DMSO, vehículo (Vh) en el que se encontraba disuelto el inhibidor de JAKs. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot o la media + DE de tres experimentos independientes. Los gráficos que acompañan a los Western blot muestran los valores de intensidad relativa de las proteínas en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de  $\beta$ -actina y representados como la media + DE (n=3). \*P<0,05, \*\*P<0,01 y \*\*\*P<0,001 con respecto a la condición 0 min en A) y Vh+IL-4 en B-D).

### 1.3 LA ACTIVACIÓN DE p38 MAPK Y PI3K ES NECESARIA PARA LA POLARIZACIÓN ALTERNATIVA DE LOS MACRÓFAGOS A TRAVÉS DE IL-4

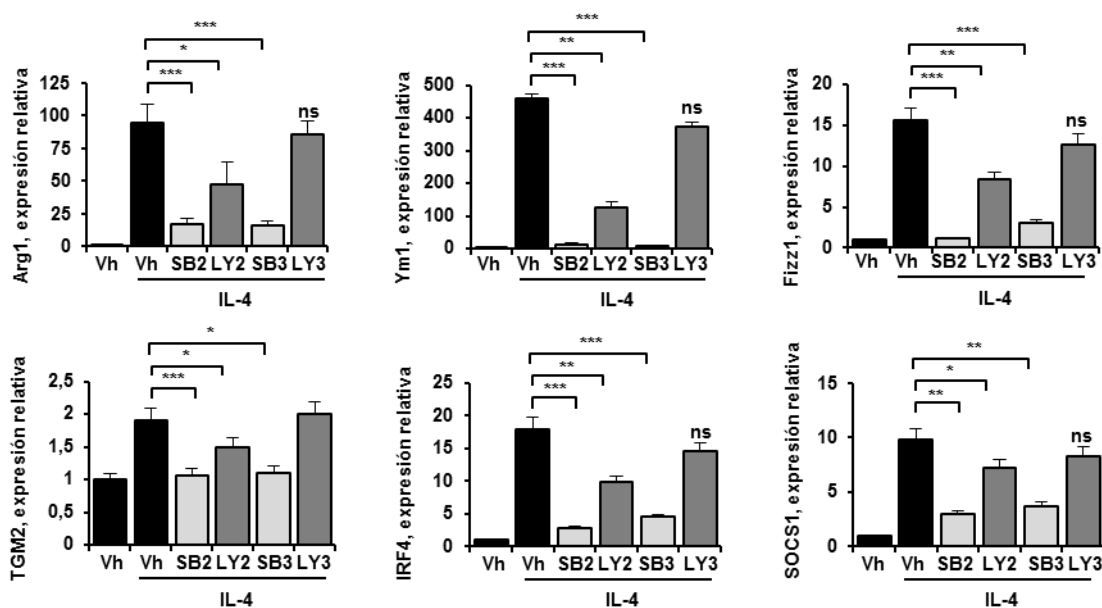
Como hemos detallado en la introducción, las JAKs no solo fosforilan a STAT6, sino que también activan a PI3K a través del reclutamiento de IRS-2 [55]. Además, algunos estudios muestran que p38 MAPK también está implicado en la señalización de IL-4 [18, 63, 105]. Nosotros quisimos investigar el posible papel de p38 MAPK en la activación alternativa de macrófagos peritoneales, y corroborar el papel de PI3K ya descrito. Para ello, estimulamos los macrófagos peritoneales con IL-4, analizando por Western blot el estado de fosforilación de p38 MAPK y de Akt como sustrato de PI3K activado. Observamos que IL-4 inducía la activación de p38 MAPK, aumentando su fosforilación a los 15 min de tratamiento, mientras que la activación de Akt no se producía hasta los 60 min (Fig.r.4). Estos resultados mostraban que p38 MAPK se activaba en respuesta a IL-4, con un patrón de activación temporal que parecía ser previo a la activación de Akt.



**Figura r.4. p38 MAPK y PI3K se activan en respuesta a IL-4.** Los macrófagos peritoneales se estimularon con IL-4 (20 ng/ml) a los tiempos indicados. Los niveles de fosforilación de p38 MAPK (p-p38) y Akt (p-Akt) se determinaron mediante Western blot. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot; y los gráficos que las acompañan, muestran los valores de intensidad relativa de las proteínas en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de β-actina y representados como la media + DE de tres experimentos independientes. \*P<0,05 y \*\*P<0,01 con respecto a la condición control (0 min).

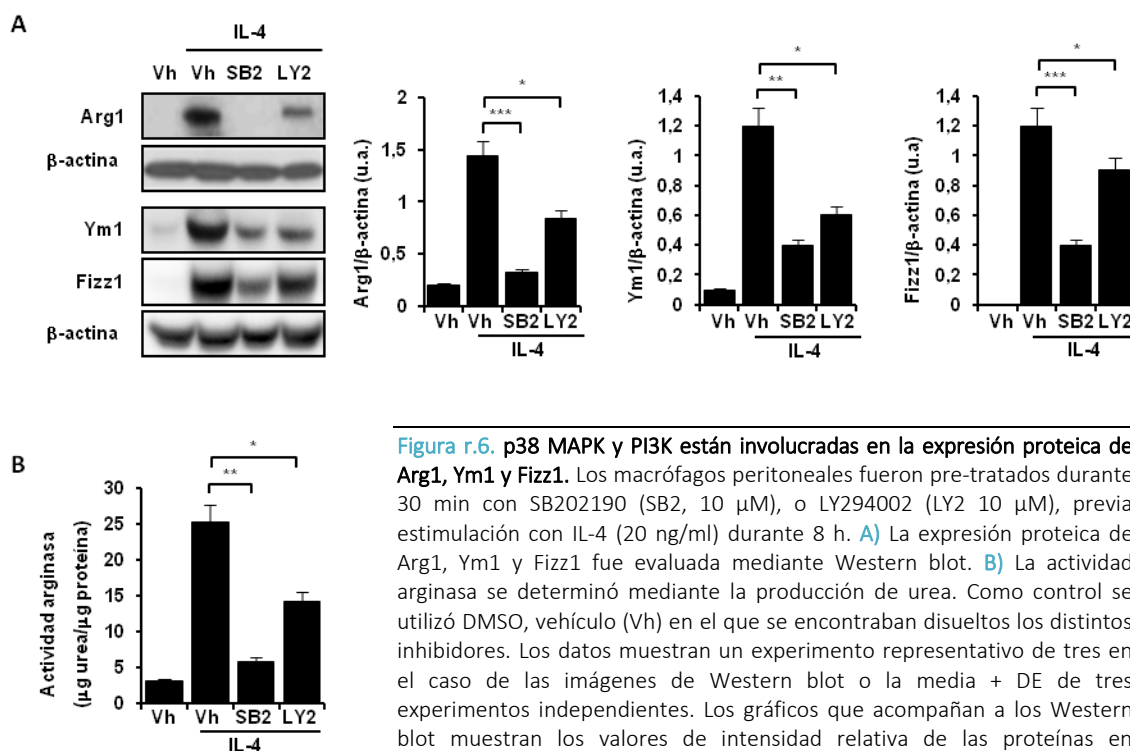
Tras confirmar que p38 MAPK se activaba en respuesta a IL-4 en macrófagos peritoneales, quisimos determinar la importancia de esta quinasa en la activación alternativa. Para ello tratamos las células con inhibidores específicos de p38 MAPK o PI3K, estimulándose posteriormente con IL-4. Los inhibidores de p38 MAPKα y β, SB202190 (SB2) y SB203580 (SB3) respectivamente, inhibieron casi en su totalidad y de forma significativa los niveles de mRNA de Arg1, Ym1, Fizz1, TGM2, IRF4 y SOCS1 tras la estimulación con IL-4 (Fig.r.5); mientras que el

inhibidor de PI3K, LY294002 (LY2), redujo parcialmente los niveles de expresión de dichos genes (Fig.r.5). La especificidad del inhibidor de PI3K, LY294002 (LY2), se confirmó mediante el pre-tratamiento de los macrófagos con LY303511 (LY3), un análogo estructural e inactivo de LY294002 (LY2). Como era de esperar, no observamos inhibición en la expresión de los marcadores M2 estudiados (Fig.r.5).



**Figura r.5.** p38 MAPK y PI3K están involucradas en la expresión de marcadores M2 inducidos por IL-4. Los macrófagos peritoneales fueron pre-tratados durante 30 min con SB202190 (SB2, 10  $\mu$ M), SB203580 (SB3, 10  $\mu$ M), LY294002 (LY2 10  $\mu$ M) o LY303511 (LY3 10  $\mu$ M), estimulándose posteriormente con IL-4 (20 ng/ml) durante 8 h. La expresión de Arg1, Ym1, Fizz1, TGM2, IRF4 y SOCS1 se determinó mediante qPCR. Como control se utilizó DMSO, vehículo (Vh) en el que se encontraban disueltos los distintos inhibidores. Los datos muestran la media + DE de tres experimentos independientes. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , y \*\*\* $P < 0,001$  con respecto a la condición Vh+IL-4.

Además, comprobamos que el tratamiento con los inhibidores de p38 MAPK (SB2) y PI3K (LY2) también afectaba a los niveles de expresión proteica de Arg1, Ym1 y Fizz1, así como a la actividad arginasa, de forma semejante a la descrita para los niveles de mRNA (Fig.r.6).

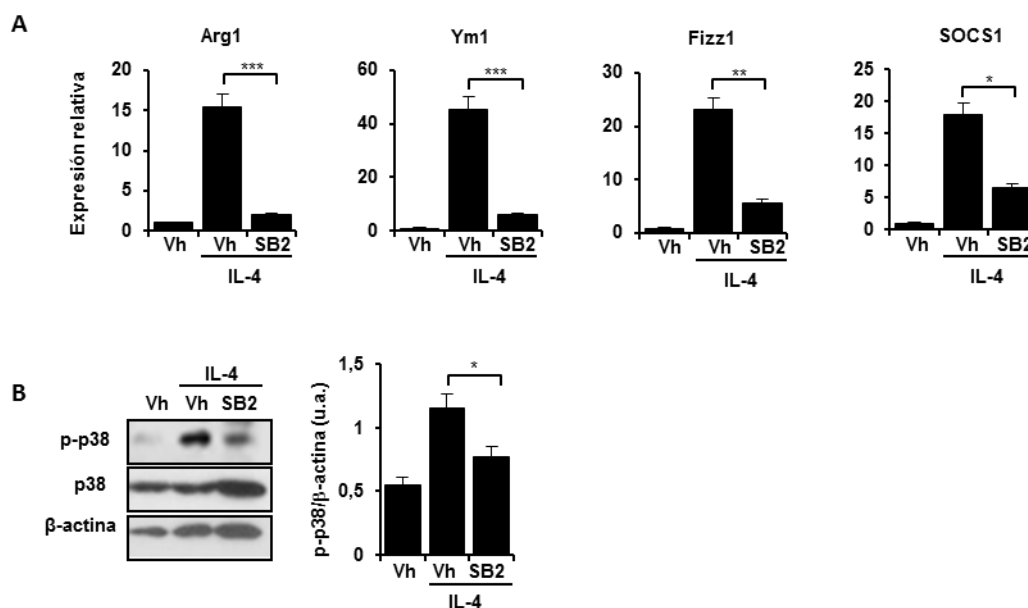


**Figura r.6.** p38 MAPK y PI3K están involucradas en la expresión proteica de Arg1, Ym1 y Fizz1. Los macrófagos peritoneales fueron pre-tratados durante 30 min con SB202190 (SB2, 10 μM), o LY294002 (LY2 10 μM), previa estimulación con IL-4 (20 ng/ml) durante 8 h. **A)** La expresión proteica de Arg1, Ym1 y Fizz1 fue evaluada mediante Western blot. **B)** La actividad arginasa se determinó mediante la producción de urea. Como control se utilizó DMSO, vehículo (Vh) en el que se encontraban disueltos los distintos inhibidores. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot o la media + DE de tres experimentos independientes. Los gráficos que acompañan a los Western blot muestran los valores de intensidad relativa de las proteínas en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de β-actina y representados como la media + DE (n=3). \*P<0,05, \*\*P<0,01, y \*\*\*P<0,001 con respecto a la condición Vh+IL-4.

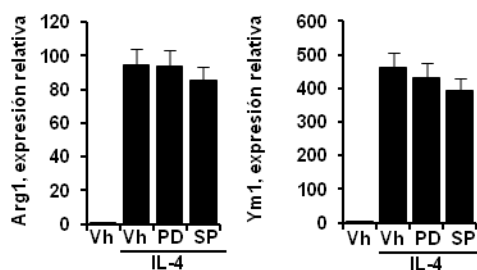
Para confirmar que la activación de p38 MAPK tras estimulación con IL-4 era un mecanismo general y descartar que los efectos del inhibidor de p38 MAPK (SB2) pudieran depender del tipo celular, estimulamos la línea celular de macrófagos murinos J774 con IL-4, en presencia o ausencia del inhibidor SB2. Observamos que tanto los niveles de mRNA de Arg1, Ym1, Fizz1 y SOCS1 (Fig.r.7A), como la fosforilación de p38 MAPK (Fig. r.7B) disminuyeron significativamente tras el pretratamiento con el inhibidor, lo que corroboraba el papel de p38 MAPK en la activación alternativa inducida por IL-4.

Por último, quisimos comprobar si otras quinasas como ERK y JNK que se ha descrito que también pueden ser fosforiladas tras la estimulación con IL-4 en algunos tipos celulares [57, 92], pudieran estar involucradas en la polarización M2 de macrófagos. Observamos que el tratamiento de macrófagos estimulados con IL-4 con los inhibidores de ERK (PD98059) y JNK

(SP600125), no afectó a la expresión de Arg1 o Ym1 (Fig.r.8), lo que indicaba que estas quinasas no parecían desempeñar un papel importante en la adquisición de un fenotipo M2.



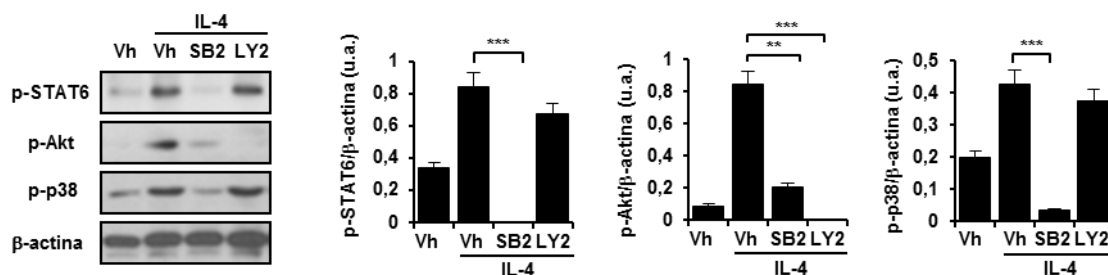
**Figura r.7. Activación de p38 MAPK y expresión de marcadores M2 en la línea celular J774.** Las células J774 fueron pre-tratadas con SB2 durante 30 min y posteriormente estimuladas con IL-4 (20 ng/ml) **A)** durante 8 h para determinar la expresión de Arg1, Ym1, Fizz1 y SOCS1 mediante qPCR, o **B)** durante 60 min para evaluar la fosforilación de p38 MAPK (p-p38) mediante Western blot. Como control se utilizó DMSO, vehículo (Vh) en el que se encontraban disueltos el inhibidor SB2. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot o la media + DE de tres experimentos independientes. El gráfico que acompaña al Western blot muestra los valores de intensidad relativa de las proteínas en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de β-actina y representados como la media + DE (n=3). \*P<0,05, \*\*P<0,01, y \*\*\*P<0,001 con respecto a la condición Vh+IL-4.



**Figura r.8. ERK y JNK no intervienen en la expresión de marcadores M2 en macrófagos estimulados con IL-4.** Los macrófagos peritoneales fueron pre-tratados durante 30 min con PD98059 (PD, 10 μM), o SP600125 (SP, 10 μM), seguido de estimulación con IL-4 (20 ng/ml) durante 8 h. La expresión de Arg1 e Ym1 se determinó mediante qPCR. Como control se utilizó DMSO, vehículo (Vh) en el que se encontraban disueltos los distintos inhibidores. Los datos muestran la media + DE de tres experimentos independientes.

## 1.4 LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE STAT6 Y PI3K DEPENDEN DE LA ACTIVACIÓN DE p38 MAPK

Se ha descrito que las vías de STAT6 y PI3K son independientes entre sí, pero a su vez se activan de forma paralela tras la estimulación del receptor de IL-4 [46, 101]. Para dilucidar el papel de p38 MAPK en la activación alternativa de los macrófagos, pre-tratamos las células con el inhibidor de p38 MAPK (SB2) o de PI3K (LY2), y posteriormente las estimulamos con IL-4. Como se esperaba, la inhibición de PI3K suprimió la fosforilación de Akt pero no la de STAT6, confirmando así la independencia de ambas vías de señalización (Fig.r.9). Además, LY2 no ejerció ningún efecto sobre la fosforilación de p38 MAPK, situando a PI3K por debajo de p38 MAPK en la vía de señalización. Por el contrario, el tratamiento con SB2 no solo inhibió la fosforilación de p38 MAPK, sino también la activación de Akt y la fosforilación de STAT6 (Fig.r.9), indicando que p38 MAPK está implicado tanto en la activación de STAT6 como de PI3K.

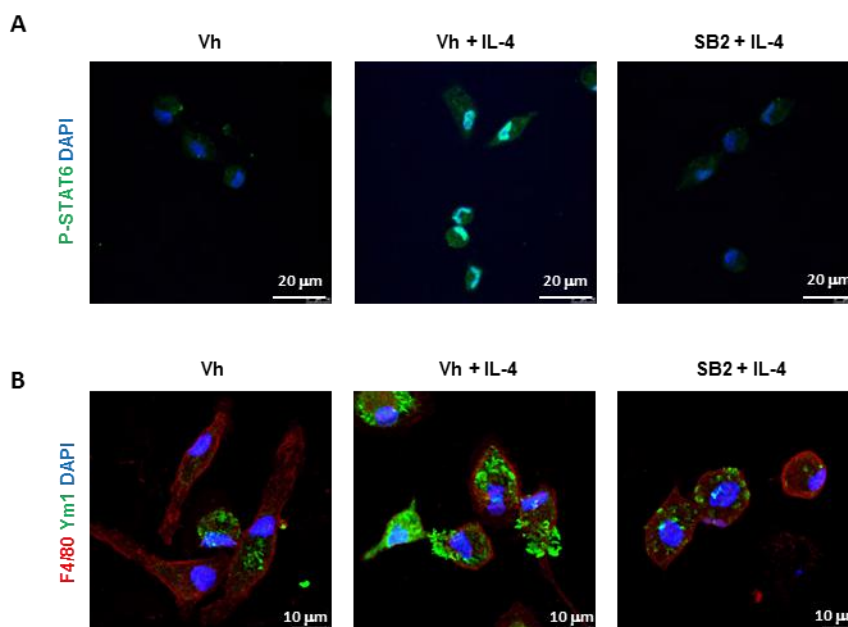


**Figura r.9.** La fosforilación de p38 MAPK es previa a la activación de STAT6 y PI3K. Los macrófagos peritoneales fueron pre-tratados durante 30 min con SB202190 (SB2, 10 μM), o LY294002 (LY2 10 μM), seguido de estimulación con IL-4 (20 ng/ml) durante 60 min. Los niveles de fosforilación de STAT6 (p-STAT6), Akt (p-Akt) y p38 MAPK (p-p38) fueron evaluados mediante Western blot. Como control se utilizó DMSO, vehículo (Vh) en el que se encontraban disueltos los distintos inhibidores. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot; y los gráficos que las acompañan, muestran los valores de intensidad relativa de las proteínas en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de β-actina y representados como la media + DE de tres experimentos independientes. \*\*P<0,01, y \*\*\*P<0,001 con respecto a la condición Vh+IL-4.

También se evaluó el efecto de SB2 sobre la activación de STAT6 y la expresión del marcador de polarización alternativa Ym1 mediante microscopía confocal. Comprobamos que, mientras la estimulación con IL-4 provocaba la fosforilación de STAT6 y su translocación al núcleo; el tratamiento con SB2 previo a la estimulación con IL-4, inhibía la fosforilación de STAT6 e impedía su transporte al núcleo; presentando, al igual que los macrófagos sin estimular, una localización principalmente citoplasmática (Fig.r.10A). De forma coincidente con la menor activación del factor de transcripción STAT6, cuando tratábamos las células con SB2 previamente a la estimulación con IL-4, observamos una menor expresión de Ym1 en



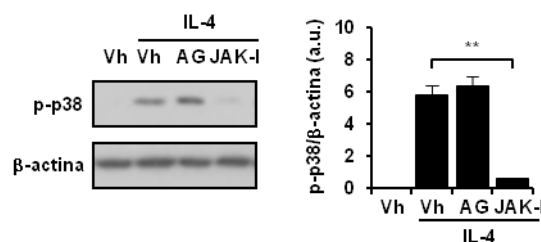
comparación con las células estimuladas únicamente con IL-4; niveles que se asemejaban a los de las células sin tratar (Fig.r.10B). Estos resultados respaldan la importancia de p38 MAPK en la activación de STAT6.



**Figura r.10.** La activación de p38 MAPK es necesaria para la activación y localización nuclear de STAT6 tras la estimulación con IL-4. **A)** Los macrófagos peritoneales fueron pre-tratados durante 30 min con SB202190 (SB2, 10 μM), seguido de estimulación con IL-4 (20 ng/ml) durante 60 min. Mediante microscopía confocal se estudió la localización y activación de STAT6. En verde se muestra p-STAT6 y en azul los núcleos teñidos con DAPI. **B)** Los macrófagos fueron pre-tratados durante 30 min con SB202190 (SB2, 10 μM), seguido de estimulación con IL-4 (20 ng/ml) durante 24h. Mediante microscopía confocal se estudió la expresión de Ym1. En verde se muestra Ym1, en rojo el marcador de macrófagos F4/80 y en azul los núcleos teñidos con DAPI.

## 1.5 JAK1 Y JAK3 SON CAPACES DE ACTIVAR A P38 MAPK

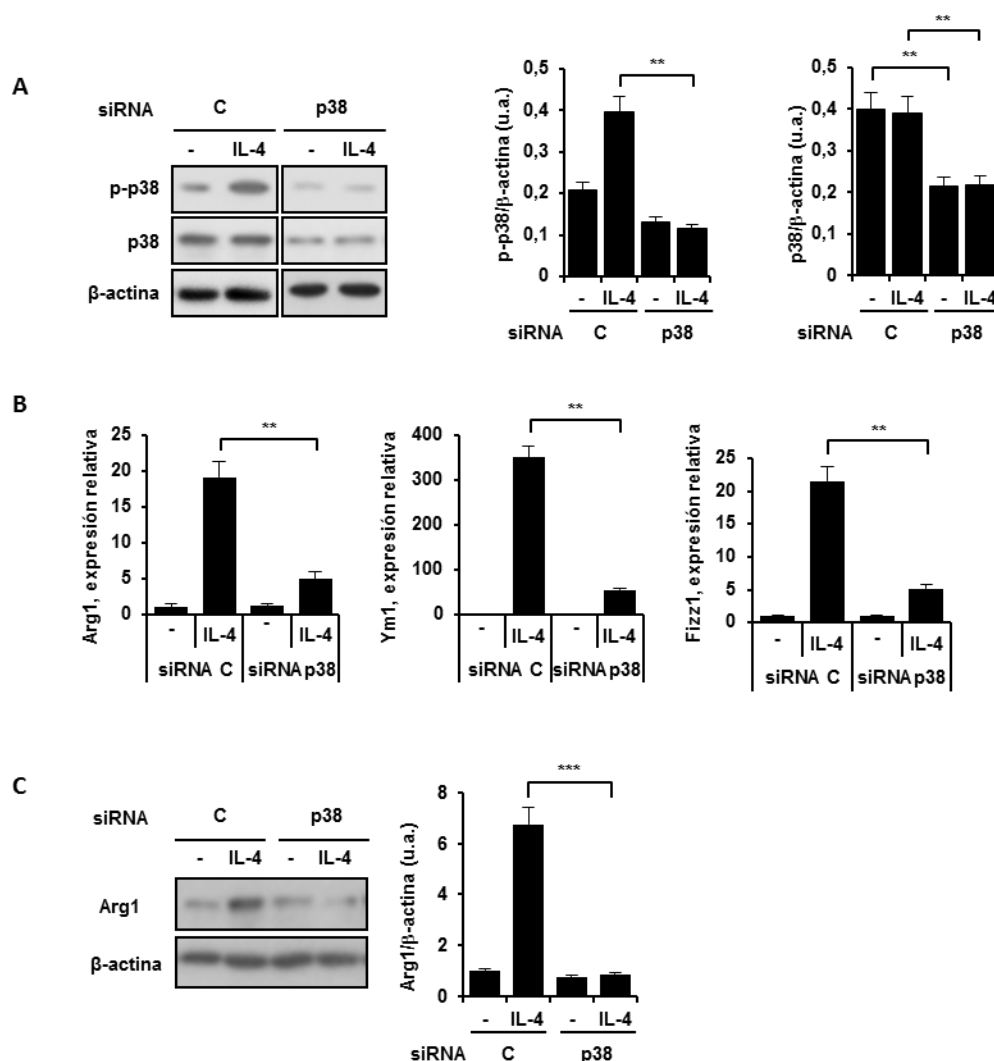
Una vez establecida la importancia de p38 MAPK en la activación del fenotipo M2 inducido por IL-4 en macrófagos peritoneales, quedaba por dilucidar en qué lugar de la ruta de señalización de IL-4 se encontraba p38 MAPK, y si éste era activado por las JAKs acopladas al receptor. Las células se trataron, previamente a la estimulación con IL-4, con JAK-I (un inhibidor general de JAKs) o AG490 (un inhibidor específico de JAK2). Observamos que JAK-I era capaz de inhibir la fosforilación de p38 MAPK, mientras que AG490 no tenía ningún efecto significativo (Fig. r.11), lo que sugería que JAK2 no parece ser importante en la activación de p38 MAPK tras la estimulación con IL-4, y que la activación de p38 MAPK depende de JAK1 y JAK3. Estos resultados están de acuerdo con los datos existentes en la bibliografía en la que se describe que, en células hematopoyéticas, IL-4 se une principalmente al receptor de tipo I provocando la activación de JAK1 y JAK3 [86] .



**Figura r.11. La fosforilación de p38 MAPK depende de JAK1 y JAK3.** Los macrófagos peritoneales fueron pre-tratados durante 30 min con AG490 (AG, 25  $\mu$ M), o JAK-I (1  $\mu$ M), seguido de estimulación con IL-4 (20 ng/ml) durante 60 min. Los niveles de fosforilación de p38 MAPK (p-p38) fueron evaluados mediante Western blot. Como control se utilizó DMSO, vehículo (Vh) en el que se encontraban disueltos los distintos inhibidores. Los datos muestran un experimento representativo en el caso de la imagen de Western blot; y el gráfico que la acompaña, muestra los valores de intensidad relativa de la proteína en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de  $\beta$ -actina y representados como la media + DE de tres experimentos independientes. \*\*P<0,01 con respecto a la condición Vh+IL-4.

## 1.6 EL SILENCIAMIENTO DE p38 MAPK SUPRIME LA EXPRESIÓN DE MARCADORES M2 INDUCIDOS POR IL-4

Se han descrito cuatro isoformas de p38 MAPK ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), siendo p38 MAPK $\alpha$  la que se expresa mayoritariamente en monocitos y macrófagos [54]. Para corroborar el papel de p38 MAPK en la polarización M2 inducida por IL-4, utilizamos siRNA específicos para silenciar p38 MAPK $\alpha$  en macrófagos. En todos los casos se utilizó como control negativo un siRNA con una secuencia no funcional. Mediante Western blot verificamos que la expresión proteica p38 MAPK se encontraba disminuida (Fig. r.12A). En la figura r.12B se muestra como el silenciamiento de p38 MAPK en macrófagos estimulados con IL-4, disminuía la expresión de mRNA de los marcadores M2 Arg1, Ym1 y Fizz1 (Fig. r.12B) así como de los niveles proteicos de Arg1. Estos datos corroboraban los resultados obtenidos previamente con los inhibidores farmacológicos de p38 MAPK.



**Figura r.12.** El silenciamiento de la expresión de p38 MAPK en macrófagos peritoneales disminuye la polarización M2 inducida por IL-4. **A)** Los macrófagos peritoneales fueron transfectados con siRNA control (C) o para p38 MAPK y posteriormente se trataron con IL-4 (20 ng/ml) durante 60 min. Mediante Western blot se analizaron los niveles de p38 MAPK fosforilado o total. **B)** Las células se trataron con IL-4 (20 ng/ml) durante 8 h después de la transfección con siRNA control o para p38 MAPK. La expresión de los marcadores M2 Arg1, Ym1 y Fizz1 fue determinada mediante qPCR. **C)** Después de la transfección con siRNA control o de p38 MAPK, las células se trataron con IL-4 (20 ng/ml) durante 24 h. Los niveles de proteína de Arg1 se evaluaron mediante Western blot. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot o la media +DE de tres experimentos independientes. Los gráficos que acompañan a los Western blot, muestran los valores de intensidad relativa de las proteínas en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de β-actina y representados como la media + DE de tres experimentos independientes. \*\*P<0,01, y \*\*\*P<0,001 con respecto a la condición control o de estimulación con IL-4.

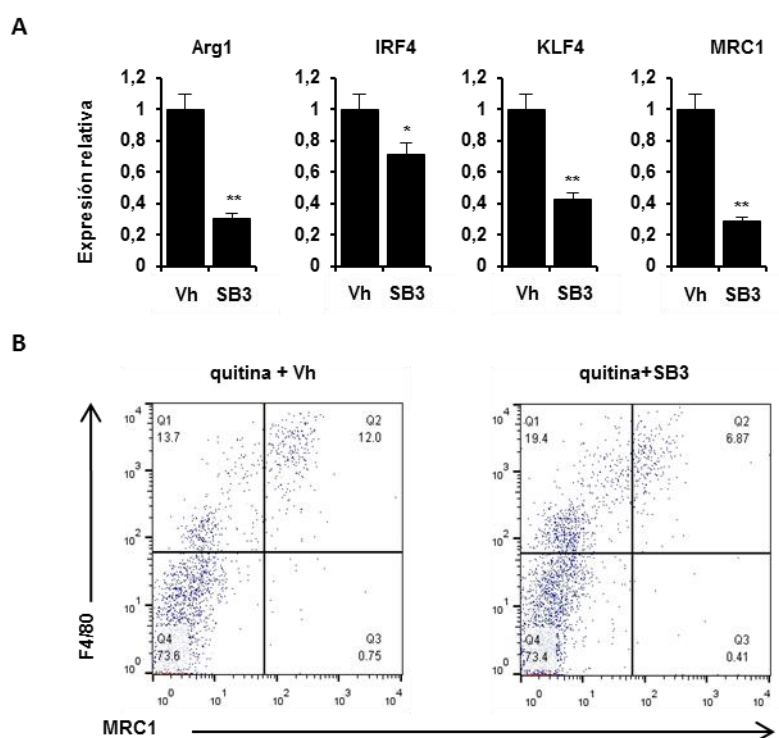
## 1.7 LA INHIBICIÓN DE P38 MAPK DISMINUYE LA POLARIZACIÓN M2 *IN VIVO*

Por último, para determinar la relevancia fisiológica de p38 MAPK en la activación alternativa de los macrófagos, utilizamos un modelo de activación *in vivo* del fenotipo M2, basado en la administración intraperitoneal de quitina. La quitina es un polímero glucídico presente en helmintos, artrópodos y hongos [114]; capaz de inducir un reclutamiento de

macrófagos, y una polarización alternativa de los mismos de forma dependiente de IL-4 [12, 123]. Observamos que 48 h después de la administración de quitina, las células presentes en el exudado peritoneal de animales tratados con el inhibidor de p38 MAPK (SB3), tenían una menor expresión de genes M2 (Arg1, IRF4, KLF4 y MRC1) (Fig.r.13A), en comparación con los animales tratados únicamente con quitina.

Además, el estudio por citometría de flujo de las poblaciones de macrófagos (células F4/80<sup>+</sup>) presentes en el exudado, mostraron una menor expresión de MRC1 en superficie (6,8% MRC1<sup>+</sup>) en los animales tratados con SB3 y quitina en comparación con los ratones que habían sido tratados únicamente con quitina (12% MRC1<sup>+</sup>) (Fig.r.13B).

En definitiva, todos estos resultados demuestran la importancia de p38 MAPK en la activación alternativa de los macrófagos.



**Figura r.13.** La inhibición de p38 MAPK *in vivo* disminuye la polarización M2 de macrófagos peritoneales reclutados por quitina. A ratones C57BL/6J se les administró intraperitonealmente 2 mg/kg de peso de SB3 (SB203580) en 1 ml de suero salino o la misma cantidad de DMSO (vehículo de SB3) como control, una hora antes de administrar la quitina (800 ng) intraperitonealmente. El exudado peritoneal se recolectó 48 h después del tratamiento. **A)** La inducción de genes asociados a una polarización M2 (Arg1, IRF4, KLF4 y MRC1) fueron evaluados mediante qPCR. Los datos muestran la media + DE de tres experimentos independientes. \*P<0,05 y \*\*P<0,01 con respecto a la condición control (Vh). **B)** La expresión de MRC1 en células F4/80<sup>+</sup> fue determinada mediante citometría de flujo. En cada cuadrante se indica el porcentaje de células.

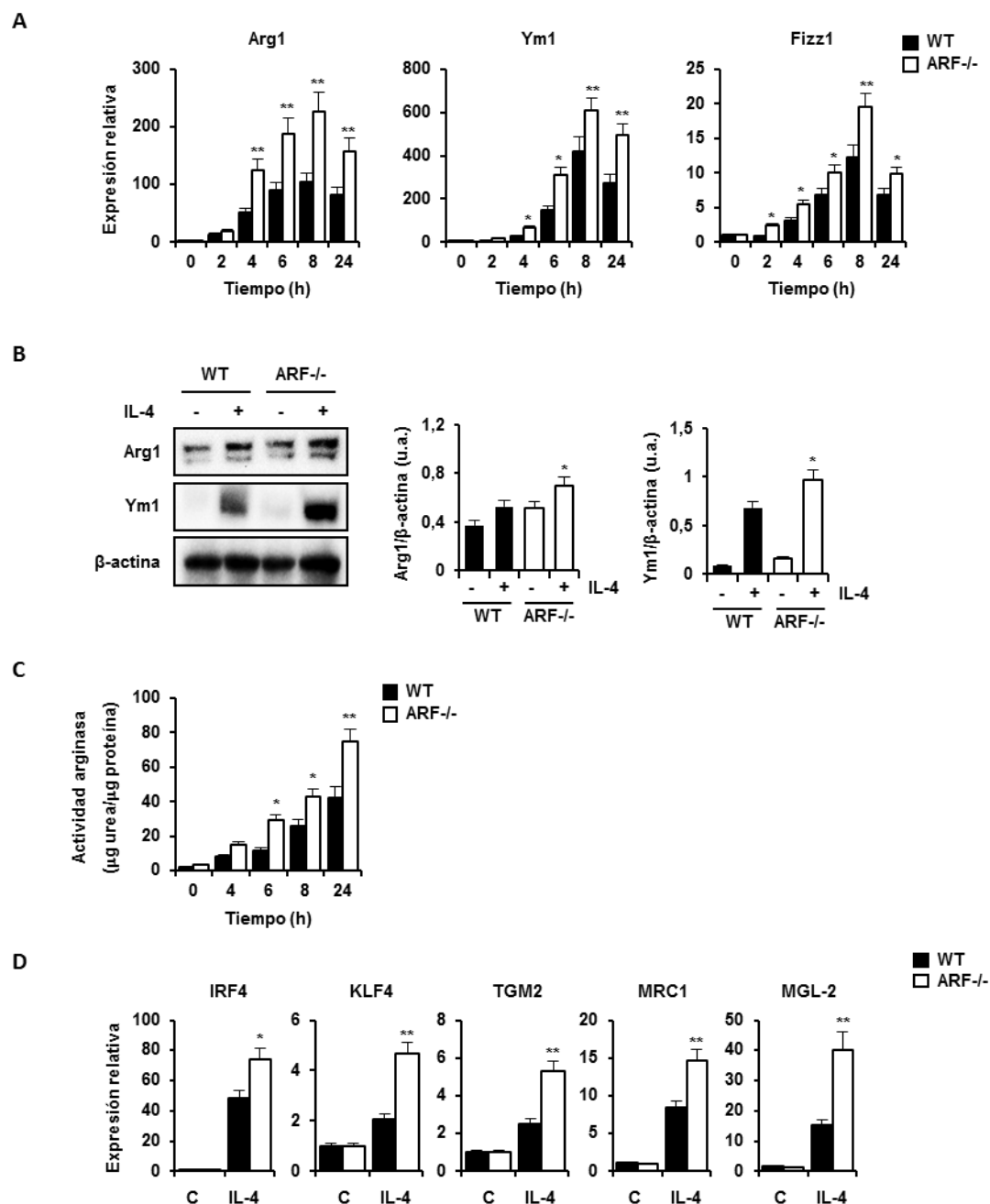
## 2. EL SUPRESOR DE TUMORES ARF: UN NUEVO REGULADOR DE LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS

### 2.1 LA AUSENCIA DE ARF PROVOCA UNA POLARIZACIÓN M2 EXACERBADA EN RESPUESTA A IL-4

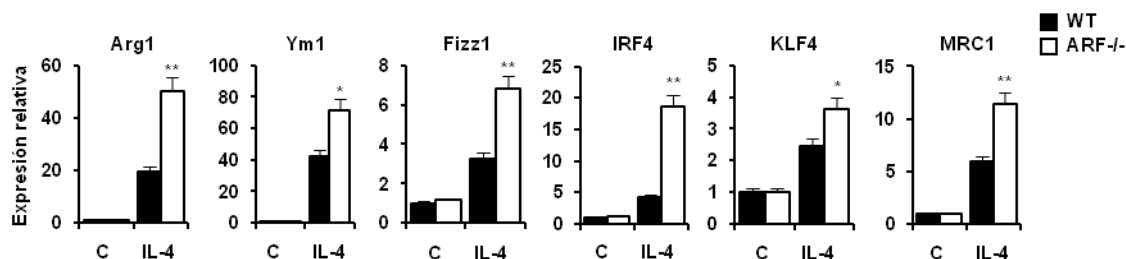
Como se ha detallado en la introducción, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la ausencia de ARF provocaba una respuesta inflamatoria deficitaria, e inducía una polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2 [56, 146]. Sin embargo, no se han explorado los mecanismos moleculares y celulares por los cuales ARF es capaz de intervenir en la re-educación de los macrófagos.

Para profundizar en el papel de ARF en la polarización alternativa de macrófagos, se aislaron macrófagos peritoneales de animales WT y ARF<sup>-/-</sup> y se estimularon con IL-4 a distintos tiempos. Tanto en los macrófagos WT como ARF<sup>-/-</sup>, los niveles de mRNA de marcadores típicos M2 como Arg1, Ym1 y Fizz1 aumentaron de forma dependiente del tiempo, con un máximo de expresión a las 8 h de estimulación. Sin embargo, aunque el patrón temporal de inducción fue similar en ambos tipos celulares, los niveles de mRNA de estos marcadores M2 eran significativamente más elevados en los macrófagos deficientes en ARF en comparación con los WT (Fig. r.14A). En consonancia con estos resultados, los niveles de proteína de Arg1 e Ym1, así como la actividad arginasa de los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> también aumentó significativamente con respecto a los WT (Fig.r.14B-C). El análisis de otros marcadores M2 como IRF4, KLF4, TGM2, MRC1 y MGL-2 también mostró una mayor expresión en los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> tras estimularlos con IL-4 (Fig.r.14D).

Una cuestión importante era si la polarización M2 exacerbada que observábamos en los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> estimulados con IL-4 estaba restringida exclusivamente a la población de macrófagos peritoneales, o si poblaciones de macrófagos procedentes de otras localizaciones también presentaban esta respuesta. Para ello aislamos macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) y analizamos la expresión de mRNA de algunos marcadores M2 (Arg1, Ym1, Fizz1, IRF4, KLF4 y MRC1). Al igual que los macrófagos peritoneales, los BMDM deficientes en ARF estimulados con IL-4 también presentaban una polarización M2 exacerbada en comparación con los WT (Fig.r.15).



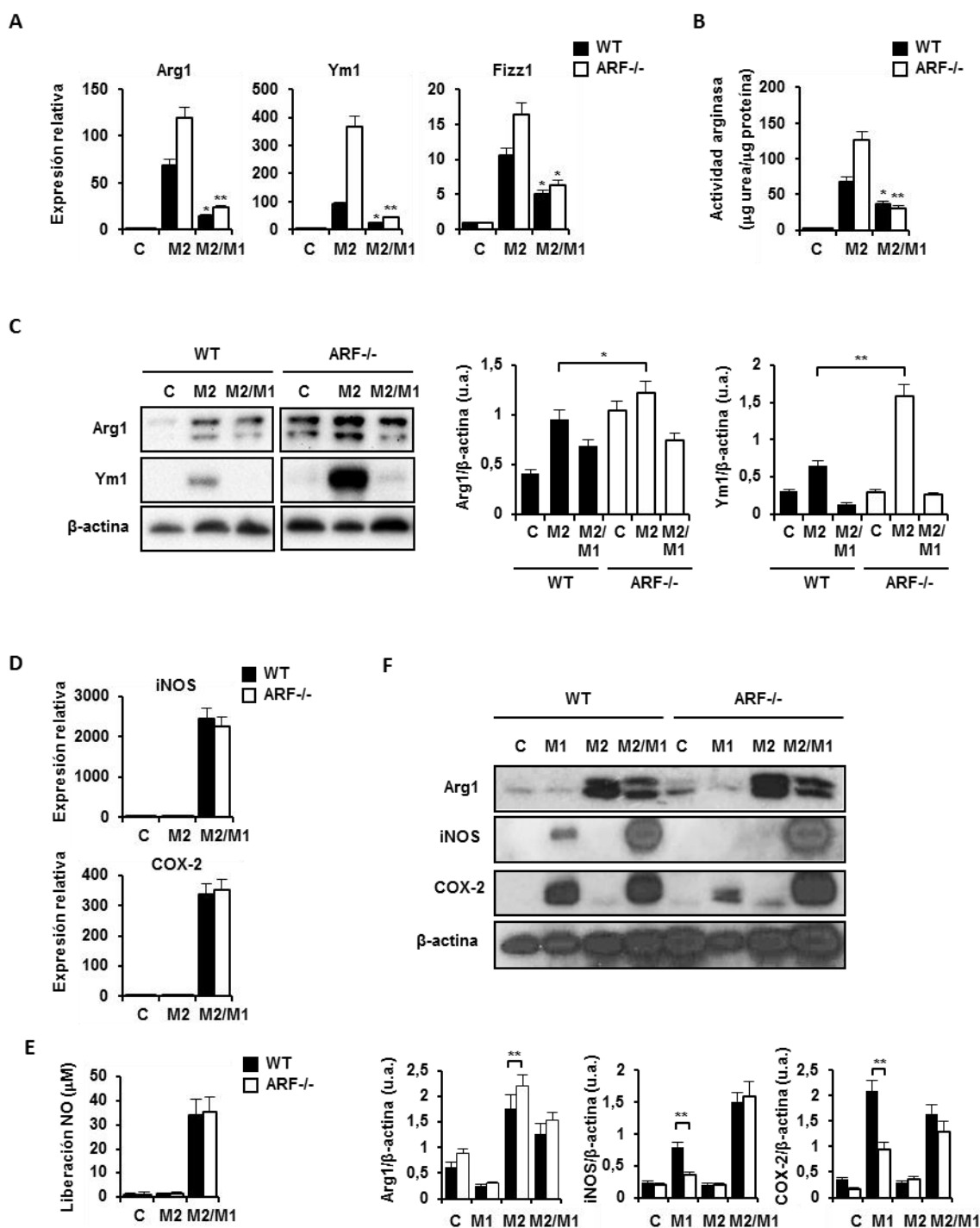
**Figura r.14.** Expresión de marcadores M2 en macrófagos peritoneales WT y ARF<sup>-/-</sup> tras la estimulación con IL-4. Macrófagos peritoneales obtenidos de animales WT y ARF<sup>-/-</sup> fueron estimulados con IL-4 (20 ng/ml) a los tiempos indicados en A) y C), 24h en B) y 6h en D). **A)** La expresión de mRNA de Arg1, Ym1 y Fizz1, fue evaluada mediante qPCR. **B)** Los niveles de proteína de Arg1 e Ym1 fueron evaluados mediante Western blot. **C)** La actividad arginasa se determinó mediante la producción de urea. **D)** La expresión de mRNA de IRF4, KLF4, TGM2, MRC1 y MGL-2, fue evaluada mediante qPCR. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot o la media + DE de tres experimentos independientes. Los gráficos que acompañan al Western blot muestran los valores de intensidad relativa de las proteínas en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de  $\beta$ -actina y representados como la media + DE de tres experimentos independientes. \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$  con respecto a la misma condición en células WT.



**Figura r.15.** Expresión de marcadores M2 en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de animales WT y ARF<sup>-/-</sup> tras la estimulación con IL-4. BMDM obtenidos de animales WT o ARF<sup>-/-</sup> fueron estimulados con IL-4 (20 ng/ml) durante 6 h. La expresión de mRNA de Arg1, Ym1, Fizz1, MRC1, IRF4, KLF4 y MRC1 fue evaluada mediante qPCR. Se muestra la media + DE de tres experimentos independientes. \*P<0,05 y \*\*P<0,01 con respecto a la misma condición en células WT.

## 2.2 LOS MACRÓFAGOS DEFICIENTES EN ARF MANTIENEN SU PLASTICIDAD

Los macrófagos tienen la capacidad no sólo de polarizarse a un fenotipo proinflamatorio (M1) o antiinflamatorio (M2), sino también de revertir ese fenotipo en función del microambiente en el que se encuentren. A este hecho se le conoce como plasticidad, y es una característica fundamental de los macrófagos que les permite mantener su funcionalidad, adaptándose al medio que les rodea. De hecho, la incapacidad de revertir el fenotipo, manteniendo un estado de activación exacerbado, ya sea M1 o M2, se encuentra en la base de diversas patologías humanas [133]. Para comprobar si los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> mantenían su plasticidad y seguían siendo funcionales a pesar de presentar un estado de activación M2 exacerbado, analizamos el efecto que producía la administración de un estímulo M1 como el LPS después de haber inducido la polarización de las células con IL-4 (estímulo M2). Observamos que los niveles de mRNA de Arg1, Ym1 y Fizz1 disminuían significativamente tras administrar LPS (Fig.r.16A), efecto que se tradujo también en una disminución en la actividad arginasa y en los niveles proteicos de Arg1 e Ym1 (Fig.r.16B-C). Además, los niveles de expresión de marcadores de activación M1 como iNOS y COX-2, así como la liberación de óxido nítrico (NO), aumentaron notablemente tras el tratamiento con LPS (Fig.r.16D-E). Estos datos demostraban que los macrófagos ARF<sup>-/-</sup>, tras haber sido tratados con IL-4, eran capaces de responder a LPS, no sólo disminuyendo los marcadores M2 sino también expresando marcadores M1 típicos. Sin embargo, no se produjo ningún cambio en la expresión de genes M1 cuando tratamos las células con IL-4, o de genes M2 cuando se estimularon con LPS (Fig.r.16F). Por lo tanto, podemos afirmar que los macrófagos deficientes en ARF son capaces de mantener su plasticidad y de adaptarse a los cambios del microambiente en el que se encuentran.

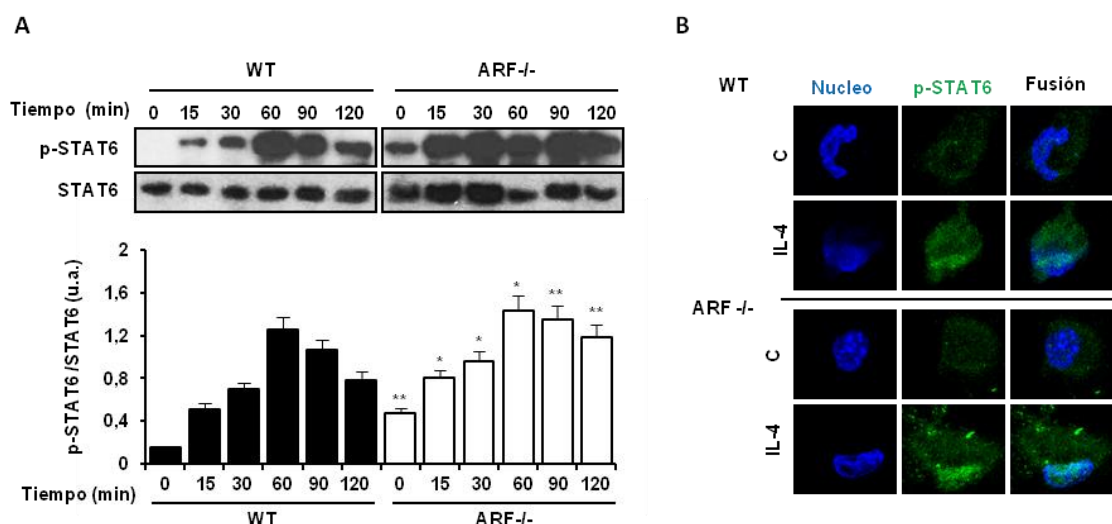


**Figura r.16. Los macrófagos ARF-/- mantienen su plasticidad, respondiendo a estímulos M1.** Macrófagos peritoneales de animales WT y ARF-/- se mantuvieron con medio o fueron estimulados con IL-4 (20 ng/ml) durante 24 h. Posteriormente se eliminó el estímulo inicial, se lavaron las células con PBS y se mantuvieron de nuevo con medio (C), con IL-4 (M2) o se trataron con LPS (10 ng/ml) (M2/M1) durante 6 h para evaluar la expresión de mRNA, o 24 h para proteína, actividad arginasa o liberación de NO. **A)** La expresión de mRNA de Arg1 e Ym1 fue evaluada mediante qPCR. **B)** La actividad arginasa se determinó mediante la producción de urea. **C)** Los niveles de proteína de Arg1, Ym1 y Fizz1 fueron evaluados mediante Western blot. **D)** La expresión de mRNA de iNOS y COX-2 fue evaluada mediante qPCR. **E)** La liberación de NO se determinó mediante la reacción de Griess. **F)** Los macrófagos se estimularon en las condiciones anteriores, pero además se añadió la condición M1 en las que las células se trataron durante 24 h con LPS (10 ng/ml); posteriormente se eliminó el estímulo inicial, se lavaron las células con PBS y se mantuvieron de nuevo con LPS (10 ng/ml) (M1) durante 24h. Los niveles de proteína de Arg1, iNOS y COX-2 fueron evaluados mediante Western blot. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot o la media + DE de tres experimentos independientes. Los gráficos que acompañan al Western blot muestran los valores de intensidad relativa de las proteínas en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de  $\beta$ -actina y representados como la media + DE (n=3). \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$  con respecto a la condición M2 de cada grupo (A-B) o comparando WT y ARF-/- en las condiciones indicadas (C-F).



## 2.3 LOS MACRÓFAGOS DEFICIENTES EN ARF PRESENTAN MAYOR ACTIVACIÓN DE STAT6

Como se ha comentado anteriormente, STAT6 es un factor de transcripción capaz de activarse mediante fosforilación por las JAKs acopladas al receptor de IL-4. Una vez activo, STAT6 es capaz de translocar al núcleo, unirse a los promotores de genes M2 e inducir su transcripción [83, 101]. Para dilucidar el mecanismo por el cual los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> tenían una polarización M2 exacerbada, estudiamos en primer lugar cómo se encontraban los niveles de STAT6 fosforilado. Para ello, estimulamos los macrófagos peritoneales con IL-4 a tiempos cortos con el objetivo de observar la dinámica de activación de STAT6. En las células WT, a los 15 minutos de estimulación ya se observaba activación de STAT6, llegando a un nivel máximo a los 60 min para decaer a los 120 min. Sin embargo, en los macrófagos deficientes en ARF el grado de fosforilación de STAT6 era significativamente mayor con respecto a los WT. Basalmente, en los macrófagos ARF<sup>-/-</sup>, STAT6 presentaba cierto grado de fosforilación y aunque su máximo de activación también se producía a los 60 min, a diferencia de los WT, parecía mantenerse durante más tiempo activo (Fig.r.17A). Mediante microscopía confocal quisimos comprobar la localización de STAT6 fosforilado en su punto de máxima activación (60 min). Observamos que en los macrófagos ARF<sup>-/-</sup>, STAT6 presentaba niveles más altos de activación, encontrándose principalmente en el núcleo (Fig.r.17B).

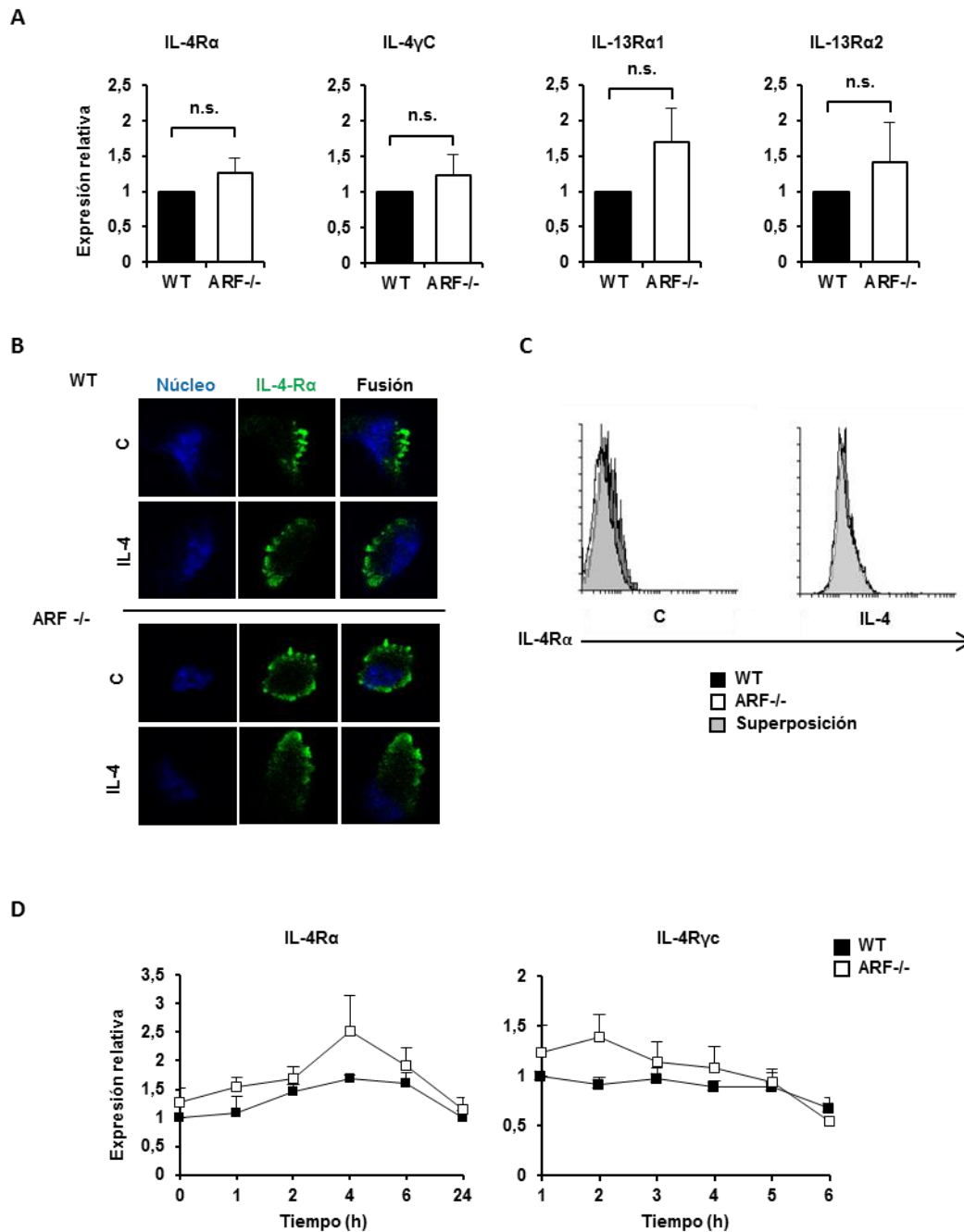


**Figura r.17. STAT6 se encuentra más activo en los macrófagos deficientes en ARF.** **A)** Macrófagos peritoneales procedentes de animales WT o ARF<sup>-/-</sup> fueron estimulados con IL-4 (20 ng/ml) a los tiempos indicados. El nivel de activación de STAT6 se evaluó mediante Western blot **B)** Macrófagos peritoneales WT o ARF<sup>-/-</sup> fueron estimulados con IL-4 (20 ng/ml) durante 60 min. Mediante inmunofluorescencia se observa la activación de STAT6 y su localización celular. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes Western blot y de los estudios de inmunofluorescencia. El gráfico que acompaña al Western blot muestra los valores de intensidad relativa de la proteína en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de STAT6 y representados como la media + DE de tres experimentos independientes. \*P<0,05, \*\*P<0,01 con respecto a la misma condición del WT.

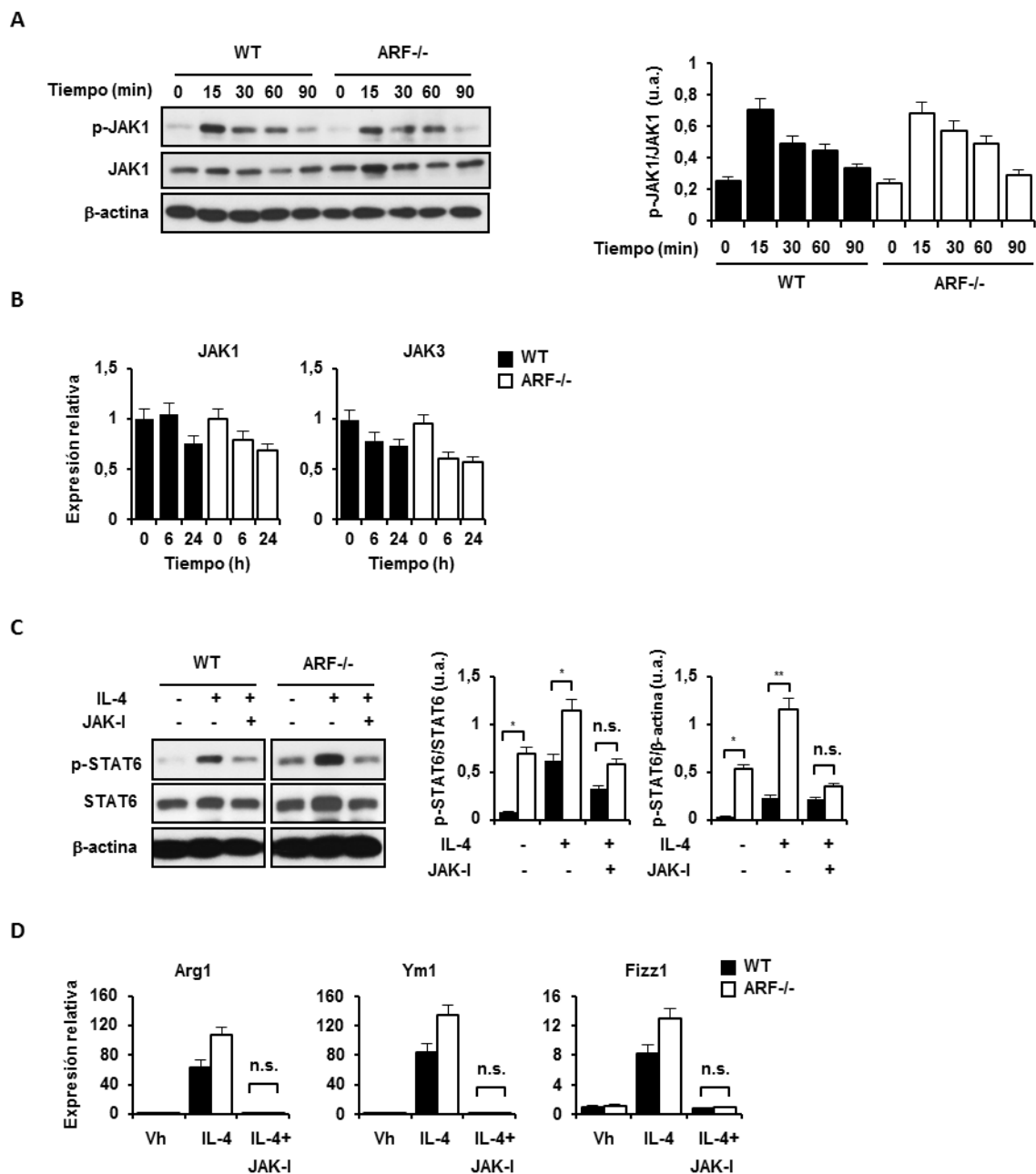
## 2.4 LOS NIVELES DE LOS RECEPTORES DE IL-4 Y LA VÍA DE JAK NO SE ENCUENTRAN ALTERADOS EN LOS MACRÓFAGOS ARF-/-

Los datos anteriores mostraban que los macrófagos ARF-/-, presentaban una mayor activación de STAT6 por lo que nos preguntamos si esto podía deberse a cambios en la expresión basal de los receptores de IL-4. Pudimos comprobar que no había diferencias significativas en la expresión de los distintos receptores, tanto de tipo I (IL-4R $\alpha$  e IL-4R $\gamma$ c) como de tipo II (IL-4R $\alpha$  e IL-13 $\alpha_1$  o IL-13 $\alpha_2$ ) entre los macrófagos ARF-/- y los WT (Fig.r.18A). Como hemos mencionado anteriormente, el receptor de tipo I formado por IL-4R $\alpha$  e IL-4R $\gamma$ c es el que se expresa mayoritariamente en las células hematopoyéticas. Cuando analizamos el patrón temporal de inducción de las dos cadenas en respuesta al tratamiento con IL-4, observamos que los niveles de expresión del receptor eran muy similares en los macrófagos ARF-/- y WT, con un máximo de expresión a las 4 h en el caso de IL-4R $\alpha$  y a las 2 h en IL-4R $\gamma$ c (Fig.r.18B). Finalmente, puesto que la cadena IL-4R $\alpha$  forma parte de los dos tipos de receptores de IL-4 (tipo I y II), estudiamos con más detalle su expresión en superficie tanto por microscopía confocal como por citometría. Los resultados indicaron que no existen diferencias significativas en la expresión de IL-4R $\alpha$  entre los macrófagos WT y ARF-/- (Fig.r.18C-D), lo que sugiere que las diferencias en la activación de STAT6 en macrófagos ARF-/- no eran debidas a cambios en los receptores de IL-4.

Una de las señales que se activa en respuesta a IL-4 es la vía de JAK. La unión de IL-4 a IL-4R $\alpha$  provoca su dimerización con IL-4R $\gamma$ c y con ello la fosforilación de JAK1 y JAK3, que una vez activas serán capaces de fosforilar a STAT6 [83, 101]. Para profundizar en el estudio de la ruta de activación de STAT6, analizamos los niveles de fosforilación de JAK1 en los macrófagos WT y ARF-/- tras la estimulación con IL-4 (Fig.r.19A). Tal y como muestra la figura 19A, no existían diferencias significativas en el grado de fosforilación de JAK1 entre los macrófagos WT y ARF-/-, del mismo modo que tampoco observamos cambios en los niveles de expresión de mRNA de JAK1 y JAK3 (Fig.r.19B). Además, utilizando un inhibidor general de JAKs (JAK-I) pudimos comprobar que la fosforilación de STAT6 se inhibía casi por completo y de forma muy similar en los macrófagos WT y ARF-/- (Fig.r.19C). Como consecuencia de este bloqueo farmacológico, la expresión de genes M2 (Arg1, Ym1 y Fizz1) también se inhibía por completo tanto en células WT como ARF-/- (Fig.r.19D).



**Figura r.18.** Los macrófagos deficientes en ARF no presentan cambios en el receptor de IL-4. **A)** Los niveles de expresión basal de los receptores de IL-4 (IL-4R $\alpha$ , IL-4R $\gamma$ C, IL-13 $\alpha$ <sub>1</sub> e IL-13 $\alpha$ <sub>2</sub>) en macrófagos peritoneales WT y ARF<sup>-/-</sup> se evaluaron mediante qPCR. **B-C)** Macrófagos peritoneales WT o ARF<sup>-/-</sup> fueron estimulados con IL-4 (20 ng/ml) durante 60 min. La expresión en superficie del receptor IL-4R $\alpha$ , tanto en condiciones control como tras la estimulación con IL-4, se determinó por inmunofluorescencia (B) y por citometría de flujo (C). **D)** Macrófagos procedentes de animales WT o ARF<sup>-/-</sup> se estimularon con IL-4 (20 ng/ml) a los tiempos indicados. La expresión de IL-4R $\alpha$  e IL-4R $\gamma$ C se evaluó mediante qPCR. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de la inmunofluorescencia y de la citometría de flujo, o la media + DE de tres experimentos independientes.

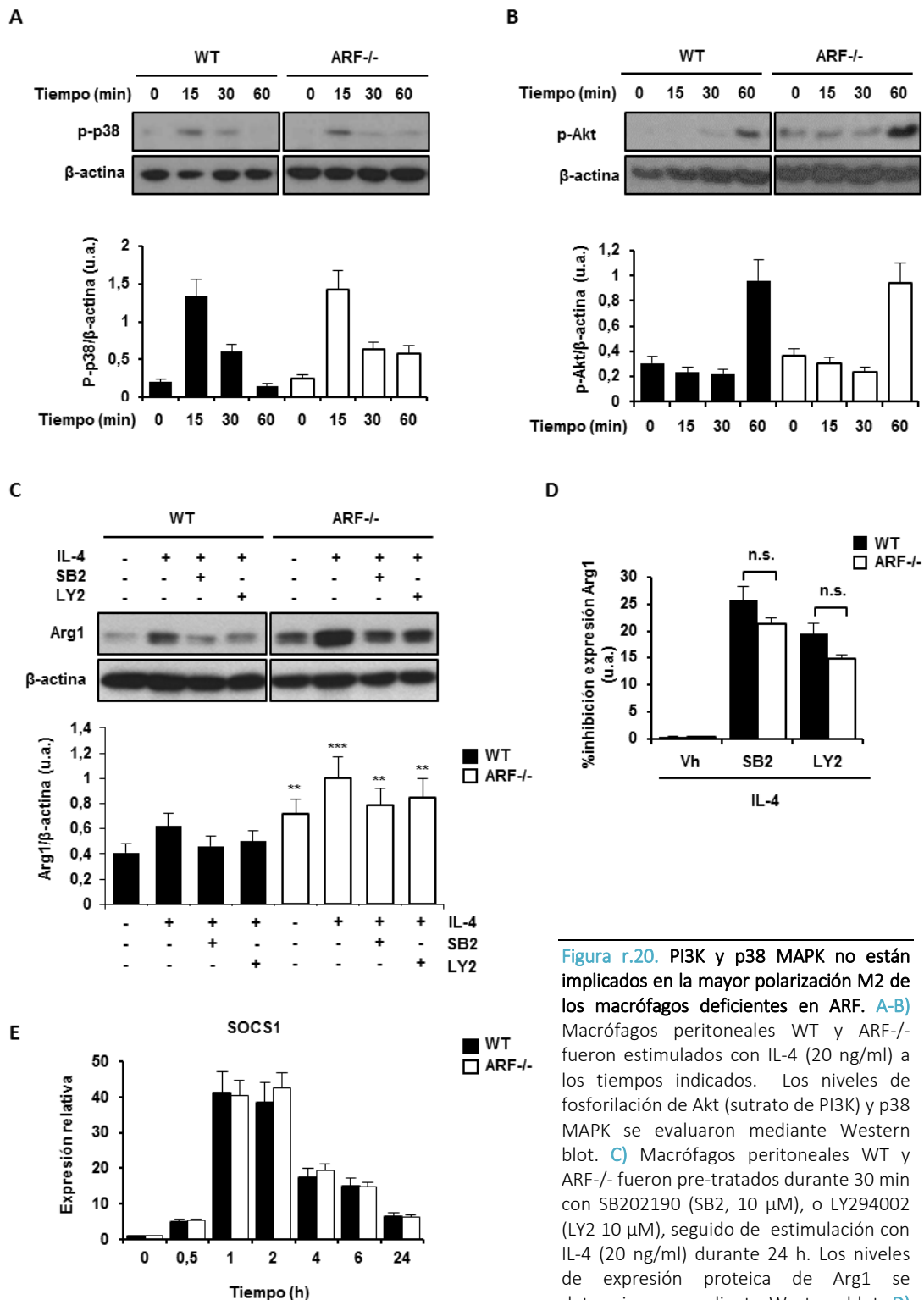


**Figura r.19.** Los macrófagos deficientes en ARF no presentan cambios en la activación de Jaks tras la estimulación con IL-4. **A y B)** Macrófagos peritoneales WT y ARF<sup>-/-</sup> fueron estimulados con IL-4 (20 ng/ml) a los tiempos indicados. Los niveles de fosforilación de p-JAK1 se determinaron mediante Western blot (A), mientras que los niveles de expresión de mRNA de JAK1 y JAK3 fueron evaluados mediante qPCR (B). **C)** Macrófagos peritoneales WT o ARF<sup>-/-</sup> fueron pre-tratados durante 30 min con JAK-I (1 μM), seguido de estimulación con IL-4 (20 ng/ml) durante 60 min evaluándose la activación de STAT6 mediante Western blot. **D)** Macrófagos peritoneales WT o ARF<sup>-/-</sup> fueron pre-tratados durante 30 min con JAK-I (1 μM), seguido de estimulación con IL-4 (20 ng/ml) durante 6 h analizando los niveles de expresión de genes M2 (Arg1, Ym1 y Flzz1) mediante qPCR. Como control se utilizó DMSO, vehículo (Vh) en el que se encontraban disueltos el inhibidor JAK-I. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot o la media + DE de tres experimentos independientes. Los gráficos que acompañan a los Western blot muestran los valores de intensidad relativa de las proteínas en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de JAK1 (A), β-actina (C) o STAT6 (C) y representados como la media + DE (n=3). \*p<0,05 y \*\*p<0,01 con respecto a la misma condición del WT.

## 2.5 LAS RUTAS DE PI3K Y p38 MAPK, ASÍ COMO EL REGULADOR NEGATIVO SOCS1 NO ESTÁN IMPLICADOS EN LA POLARIZACIÓN M2 EXACERBADA DE LOS MACRÓFAGOS DEFICIENTES EN ARF

Como se ha detallado en la introducción, además de la ruta de señalización de STAT6, la unión de IL-4 al receptor de tipo I induce de forma paralela otra vía iniciada por IRS-2 y PI3K. Una vez que IRS-2 se activa, es capaz de activar a PI3K conduciendo en última instancia a potenciar la expresión de genes M2 [55]. Además, como hemos descrito el apartado 1 de los resultados, p38 MAPK también juega un papel fundamental en la polarización M2 de macrófagos participando en la activación de STAT6 y PI3K. Quisimos comprobar si el estado de activación M2 exacerbado que encontrábamos en los macrófagos deficientes en ARF en presencia de IL-4, se debía exclusivamente a una alteración en la ruta de STAT6 o si también se encontraba implicada la ruta de PI3K o la activación de p38 MAPK. Como se puede ver en la figura r.20A y r.20B, no observamos diferencias significativas en los niveles de fosforilación de p38 MAPK en los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> al compararlos con los WT (Fig.r.20A-B), así como tampoco se observaron diferencias en los niveles de fosforilación de Akt, diana de PI3K activado. Además, cuando se trataron las células con inhibidores farmacológicos de p38 MAPK (SB203580) y PI3K (LY294002), previamente a la estimulación con IL-4; observamos que aunque los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> presentaban una mayor expresión de Arg1 tanto a nivel basal como tras estimulación con IL-4 con respecto a los WT, el grado de inhibición de este marcador M2 era similar (Fig.r.20C-D), lo que indicaba que si bien las quinasas p38 MAPK y PI3K se encontraban implicadas en la polarización M2, lo hacían de la misma forma tanto en macrófagos WT como ARF<sup>-/-</sup>.

Entre las señales implicadas en la regulación negativa de la vía de señalización de JAK/STAT6 destaca la proteína SOCS1 [83]. Se ha descrito que IL-4 induce rápidamente la síntesis *de novo* de SOCS1 en macrófagos, y que ésta es dependiente de STAT6 [25, 158]. Para profundizar en el estudio de los mecanismos implicados en la mayor activación de STAT6 presente en los macrófagos ARF<sup>-/-</sup>, decidimos explorar si los niveles de este inhibidor diferían entre los macrófagos WT y ARF<sup>-/-</sup>. Para ello estimulamos los macrófagos con IL-4 a distintos tiempos y analizamos los niveles de inducción de mRNA de SOCS1. Tanto los macrófagos WT como ARF<sup>-/-</sup> presentaban una regulación muy similar, con un máximo de expresión de SOCS1 entre 1 y 2 h tras la estimulación con IL-4 (Fig.r.20E).



**Figura r.20.** PI3K y p38 MAPK no están implicados en la mayor polarización M2 de los macrófagos deficientes en ARF. **A-B)** Macrófagos peritoneales WT y ARF<sup>-/-</sup> fueron estimulados con IL-4 (20 ng/ml) a los tiempos indicados. Los niveles de fosforilación de Akt (sustrato de PI3K) y p38 MAPK se evaluaron mediante Western blot. **C)** Macrófagos peritoneales WT y ARF<sup>-/-</sup> fueron pre-tratados durante 30 min con SB202190 (SB2, 10  $\mu$ M), o LY294002 (LY2 10  $\mu$ M), seguido de estimulación con IL-4 (20 ng/ml) durante 24 h. Los niveles de expresión proteica de Arg1 se determinaron mediante Western blot. **D)** Se muestra el porcentaje de inhibición de

Arg1 en macrófagos WT y ARF<sup>-/-</sup> estimulados con IL-4 cuando son tratados con SB2 o LY2. **E)** Macrófagos peritoneales WT y ARF<sup>-/-</sup> fueron estimulados con IL-4 (20 ng/ml) a los tiempos indicados. La expresión de mRNA de SOCS1 fue evaluada mediante qPCR. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot o la media + DE de tres experimentos independientes. Los gráficos que acompañan a los Western blot muestran los valores de intensidad relativa de las proteínas en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles  $\beta$ -actina y representados como la media + DE (n=3). \*\*P<0,01 y \*\*\*P<0,001 con respecto a la misma condición del WT.

## 2.6 STAT6 PERMANECE MÁS TIEMPO ACTIVO EN EL NÚCLEO DE LOS MACRÓFAGOS DEFICIENTES EN ARF TRATADOS CON IL-4

Se ha descrito que para que STAT6 se mantenga activo, requiere un ciclo continuo de activación, importe nuclear, desactivación, exporte nuclear y reactivación [3]. Puesto que no observamos diferencias en la regulación de la ruta a los niveles anteriormente descritos, nos centramos en el estudio del reciclamiento de STAT6 entre el núcleo y el citoplasma.

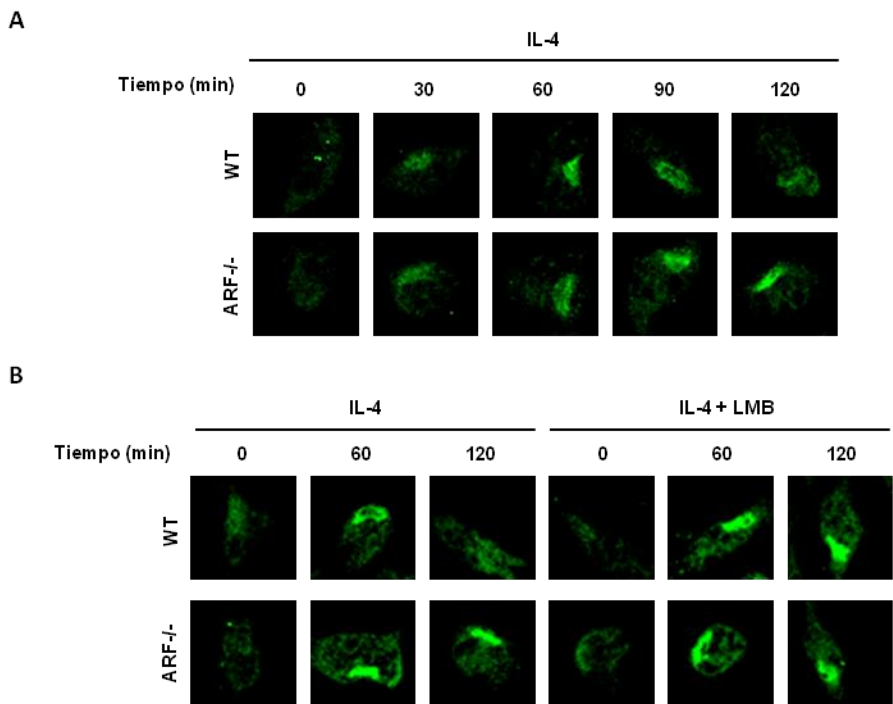
Mediante inmunofluorescencia estudiamos la localización de STAT6 en macrófagos WT y ARF<sup>-/-</sup> a lo largo del tiempo tras la estimulación con IL-4. En la figura r.21A se puede ver cómo tras 30 min de estimulación, STAT6 se encontraba activo en el núcleo tanto de las células WT como ARF<sup>-/-</sup>. Sin embargo, mientras que los macrófagos WT alcanzaban su máximo de activación a los 60 min, disminuyendo posteriormente (90 y 120 min); los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> mantuvieron sus niveles de activación al menos hasta los 120 min (Fig r.21A).

Estos resultados sugerían que el déficit en ARF podía estar alterando el mecanismo de exporte de STAT6 del núcleo al citoplasma y que ésta podría ser la causa por la que se mantenía más tiempo en el núcleo. Puesto que se ha descrito que otros miembros de la familia de STAT6 se unen a la exportina CRM-1 (*Chromosomal Maintenance 1*) para transportarse del núcleo al citoplasma [115, 116], pre-tratamos las células durante 30 min con leptomicina B (LMB), un inhibidor de CRM-1, para inhibir el exporte nuclear y posteriormente las estimulamos con IL-4 a distintos tiempos. En la figura r.21B se observa cómo el tratamiento con LMB permitía que STAT6 se mantuviese más tiempo activo en el núcleo de los macrófagos WT (120 min), igualando sus niveles de fosforilación a los de los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> (Fig r.21B).

## 2.7 LOS MACRÓFAGOS ARF<sup>-/-</sup> TAMBIÉN PRESENTAN MAYOR LOCALIZACIÓN DE C/EBPβ EN EL NÚCLEO

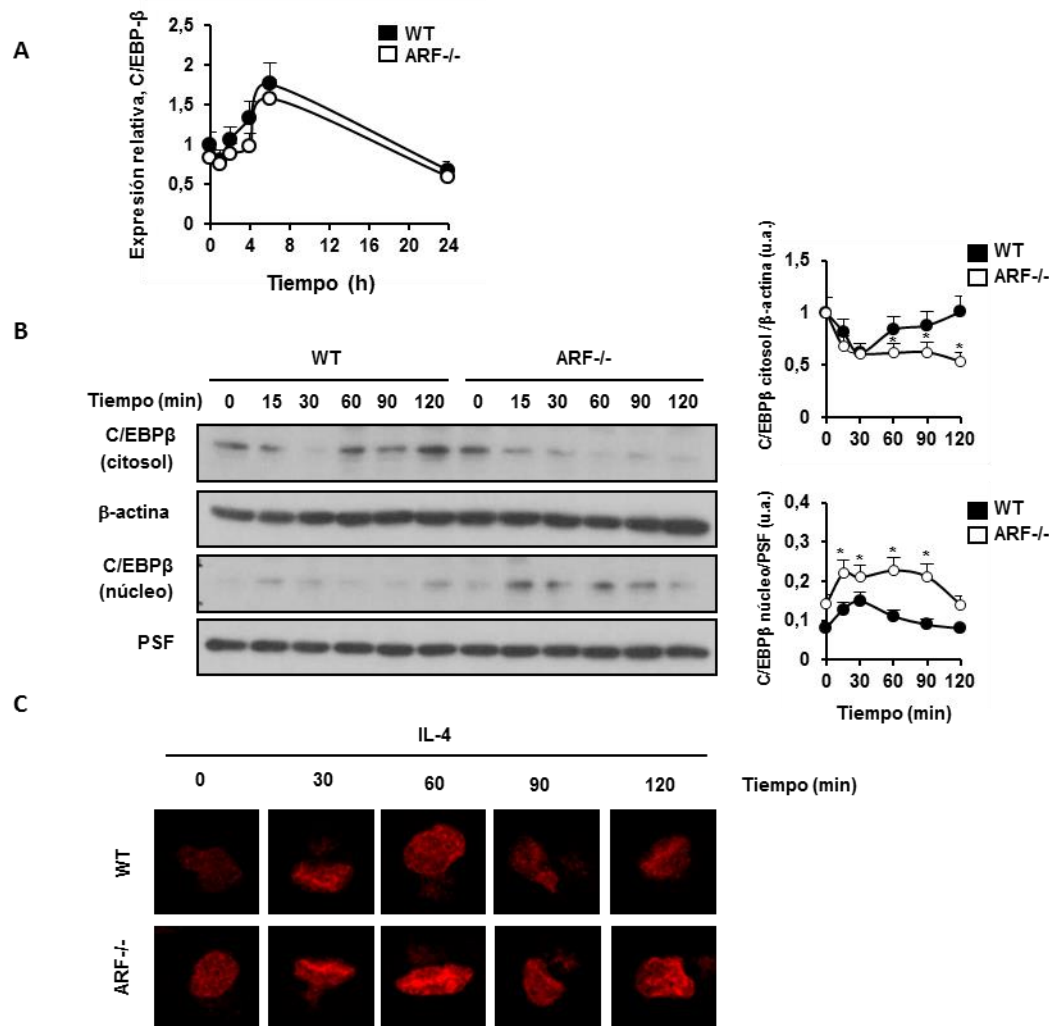
Para confirmar el papel de ARF en la regulación del exporte nuclear, quisimos explorar si C/EBPβ, un factor de transcripción capaz de cooperar con STAT6 en la regulación de la expresión de genes M2 y que también se ha descrito que se transloca del citosol al núcleo [103, 139], permanecía más tiempo en el núcleo de los macrófagos ARF<sup>-/-</sup>. En primer lugar comprobamos si la expresión de C/EBPβ en respuesta a IL-4 se modificaba por la ausencia de ARF. Observamos que no había diferencias significativas, ni en la expresión basal de C/EBPβ ni tras estimulación con IL-4, entre los macrófagos WT y ARF<sup>-/-</sup> (Fig.r.22A). Posteriormente, puesto que C/EBPβ ejerce su función en el núcleo, evaluamos la localización de este factor de

transcripción tanto por Western blot (Fig.r.22B) como por microscopía confocal (Fig.r.22C). Al estimular macrófagos WT y ARF<sup>-/-</sup> con IL-4 pudimos comprobar que, al igual que STAT6, también había una mayor localización en el núcleo de C/EBP $\beta$  en el caso de los macrófagos ARF<sup>-/-</sup>.



**Figura r.21.** STAT6 permanece más tiempo activo en el núcleo en los macrófagos ARF<sup>-/-</sup>. **A)** Macrófagos peritoneales WT y ARF<sup>-/-</sup> fueron estimulados con IL-4 (20 ng/ml) a los tiempos indicados. **B)** Macrófagos peritoneales WT y ARF<sup>-/-</sup> fueron pre-tratados con Leptomicina B (10 ng/ml) durante 30 min y posteriormente se estimularon con IL-4 (20 ng/ml) a los tiempos indicados mediante microscopía confocal se estudió la localización y activación de STAT6. En verde se muestra p-STAT6.

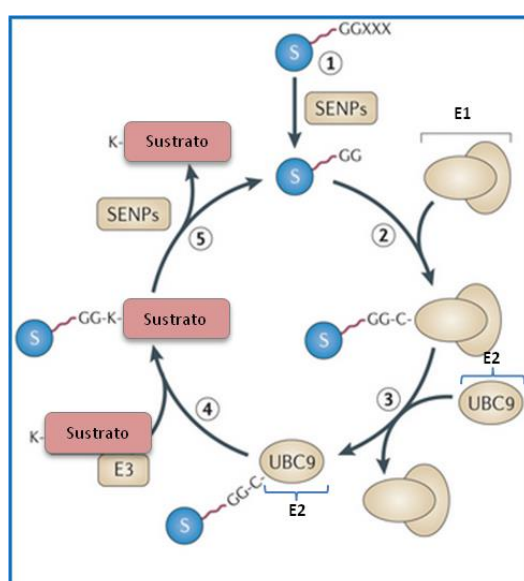




**Figura r.22.** Los macrófagos deficientes en ARF presentan mayor localización nuclear de C/EBP $\beta$ . Macrófagos peritoneales WT y ARF-/- fueron estimulados con IL-4 (20 ng/ml) a los tiempos indicados. **A)** Los niveles de expresión de mRNA de C/EBP $\beta$  fueron evaluados mediante qPCR **B)** La localización de C/EBP $\beta$  se estudió mediante Western blot separando las fracciones citosólica y nuclear. **C)** Mediante microscopía confocal evaluamos los niveles de C/EBP $\beta$  en el núcleo tras estimulación con IL-4. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot y la inmunofluorescencia, o la media + DE de tres experimentos independientes. Los gráficos que acompañan al Western blot muestran los valores de intensidad relativa de la proteína en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de  $\beta$ -actina en los extractos citosólicos o con PSF en los extractos nucleares, y representados como la media + DE (n=3). \*p<0,05 con respecto a la misma condición del WT.

## 2.8 PAPEL DE ARF EN LA REGULACIÓN DEL TRANSPORTE CITOSOL-NÚCLEO: SUMOILACIÓN Y/O FORMACIÓN DE COMPLEJOS

Los resultados anteriores indicaban que ARF podría desempeñar un papel importante en el transporte de proteínas del núcleo al citosol, y en concreto de STAT6, por lo que decidimos analizar este proceso con más detalle. Entre los mecanismos implicados en el transporte de proteínas del citosol al núcleo y viceversa, se ha descrito que la sumoilación desempeña un papel importante. La sumoilación es una modificación post-traduccional que consiste en la unión covalente de un péptido similar a la ubiquitina denominado SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*), a determinadas proteínas (Fig.r.23)[38].



**Figura r.23. Mecanismo de sumoilación.** SUMO tiene que ser procesado (1) para poder unirse a una enzima activadora E1 (2). Esta enzima media la transferencia de SUMO a Ubc9 que es la enzima conjugadora E2, formándose un complejo Ubc9-SUMO (3). Posteriormente la enzima ligasa E3, interacciona con el sustrato y actúa como molécula adaptadora, transfiriendo SUMO desde complejo SUMO-E2 al sustrato). La enzima E3 ligasa actúa acelerando y aumentando la eficacia de la transferencia de SUMO.E3 ligasa interacciona con el sustrato, recluta a Ubc9-SUMO promoviendo la transferencia de SUMO al sustrato (4). Esquema modificado de Rodríguez J a. *Interplay between nuclear transport and ubiquitin/SUMO modifications in the regulation of cancer-related proteins. Semin Cancer Biol* 2014.

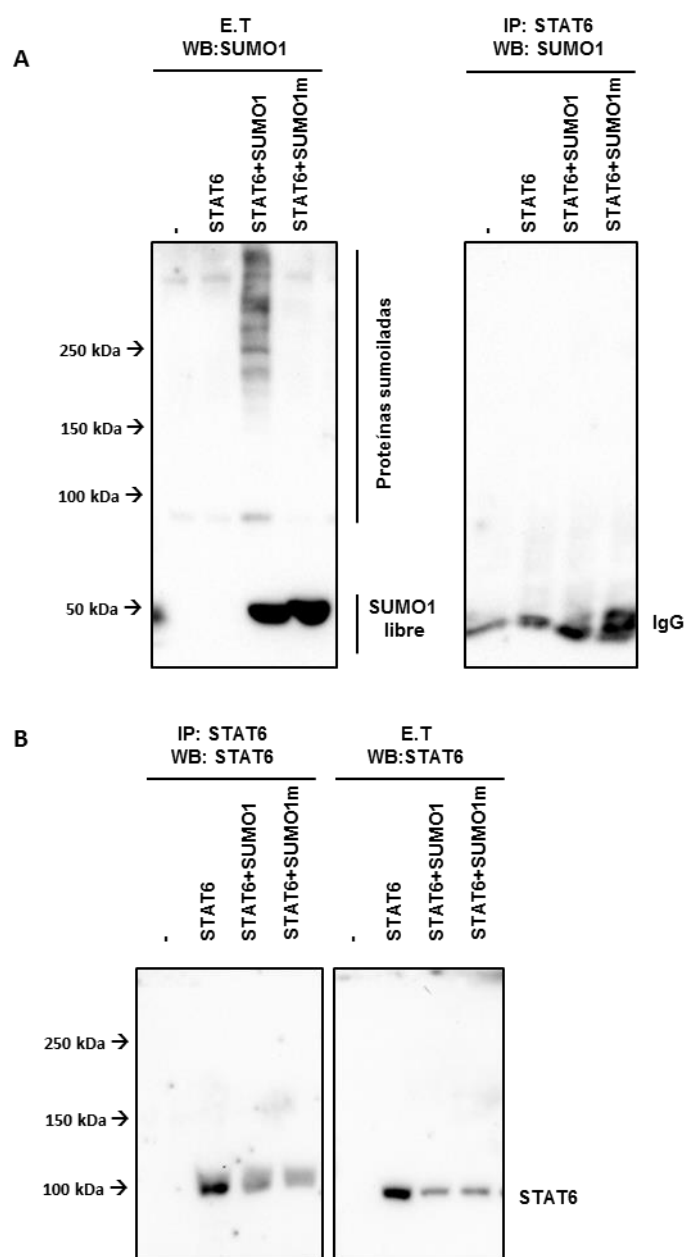
Diversos datos en la literatura nos hicieron pensar que la sumoilación podría ser el mecanismo que regula el exporte de STAT6 del núcleo al citoplasma y que ARF podría estar implicado en este proceso. En primer lugar se ha descrito que la sumoilación de algunas proteínas como p53, debilita su interacción con la exportina CRM-1, facilitando su salida al citoplasma [76, 122]. En segundo lugar, se sabe que otros miembros de la familia de STAT6, como STAT1, STAT3 o STAT5, se unen también a CRM-1 para el transporte núcleo-citoplasma [115, 116]. En tercer lugar, STAT1 es capaz de sumoilarse en el núcleo, y aunque no se conoce cuál es el objetivo de la sumoilación, se baraja que pueda estar implicada en el exporte nuclear [120, 172]. En cuarto lugar, se ha descrito que algunas de las proteínas a las que se une ARF son sumoiladas de forma ARF-dependiente [21, 76, 118, 164], de hecho Kobayashi y colaboradores describieron recientemente que ARF interacciona físicamente con la proteína REGy promoviendo su sumoilación y su exporte nuclear [76].

En primer lugar quisimos comprobar si STAT6 contenía sitios potenciales de sumoilación. SUMO se conjuga preferentemente a lisinas localizadas en la secuencia consenso  $\psi$ -K-X-E donde  $\psi$  es un aminoácido hidrofóbico grande (como leucina, isoleucina o valina); K es la lisina a la que se conjuga SUMO; X es cualquier aminoácido; y E es ácido glutámico [38]. Mediante el software *GPS-SUMO* pudimos comprobar que STAT6 contenía una secuencia susceptible de sumoilación en la lisina 621, y que dicha secuencia se encontraba conservada en ratón y humano (Tabla r.1).

**Tabla r.1.** Predicción de sitios de sumoilación de STAT6

Posición K	Péptido	Especie
621	NLYPKKPKDEAFRSH	<i>Mus musculus</i>
621	NLYPKKPKDEAFRSH	<i>Homo sapiens</i>

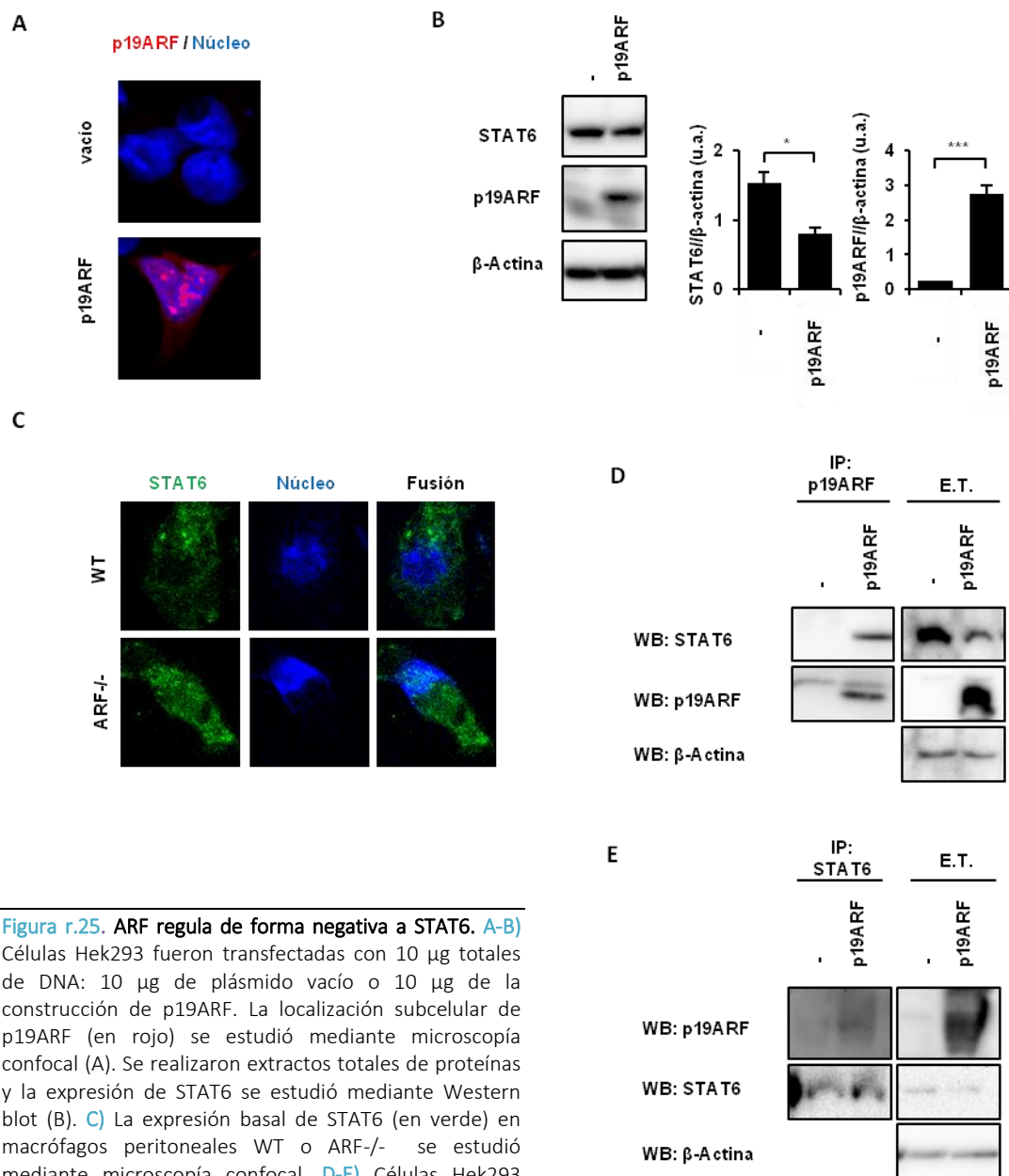
Para comprobar si STAT6 era sumoilado, transfectamos células Hek293 con construcciones para STAT6, SUMO1 y un SUMO1 mutado (SUMO1m) que no es capaz de sumoilar. Los extractos totales revelados con un anticuerpo frente a SUMO1, mostraron bandas de sumoilación en las condiciones en las que se transfectaron conjuntamente SUMO1 y STAT6, mientras que la co-transfección con la forma mutada de SUMO1 no permitió detectar ninguna banda en el extracto total (Fig.r.24A). También detectamos la banda de SUMO1 libre (normal y mutado), lo que confirmaba que la transfección se había realizado correctamente (Fig.r.24B). Estos resultados indicaban que SUMO1 era capaz de sumoilar proteínas presentes en las células Hek293. Para comprobar si STAT6 se sumoilaba, también se co-inmunoprecipitaron los extractos totales con un anticuerpo frente a STAT6 y se revelaron frente a SUMO-1. No se observó ninguna banda de sumoilación, lo que sugería que en estas condiciones STAT6 no parecía sumoilarse. Además, se reveló frente a STAT6 tanto en el extracto total como en los extractos inmunoprecipitados para comprobar que el experimento se había realizado correctamente (Fig.r.24B).



**Figura r.24. STAT6 no sufre sumoilación.** Células Hek293 fueron transfectadas con 10 µg totales de DNA: 5 µg de cada construcción en el caso de las transfecciones dobles y en el caso de las transfecciones simples 5 µg de la construcción más 5 µg de plásmido vacío. Se realizaron transfecciones con el plásmido vacío como control negativo (-); sólo con la construcción de STAT6; o se cotransfectó STAT6 con SUMO1 o SUMO1m. Se realizaron extractos de proteína totales (E.T.) y también se inmunoprecipitó (IP) STAT6. **A-B)** Se detectó la presencia de SUMO1 (A) o STAT6 (B) mediante Western blot en el extracto total y tras la inmunoprecipitación con STAT6. Los datos muestran un experimento representativo de tres.

Otra posibilidad era que ARF estuviese interaccionando con STAT6. Puesto que en macrófagos peritoneales la expresión endógena de ARF es muy baja [146] y no es posible detectarla mediante Western blot o por estudios de confocal, llevamos a cabo transfecciones de células Hek293 con una construcción para p19ARF. Mediante microscopía confocal comprobamos que, p19ARF transfectado en células Hek293 tenía una localización nucleolar (Fig.r.25A). Posteriormente, mediante Western blot de los extractos totales, pudimos observar que los niveles de STAT6 endógeno disminuían en presencia de p19ARF, lo que sugería que ARF estaba regulando negativamente a STAT6 (Fig.r.25B). Estos resultados fueron corroborados en macrófagos peritoneales WT y ARF<sup>-/-</sup> mediante inmunofluorescencia de STAT6. En la figura r.25C se puede comprobar cómo, al igual que ocurre con las Hek293 sin transfectar con p19ARF, en los macrófagos deficientes en ARF los niveles de STAT6 son más elevados que en los macrófagos WT (Fig.r.25C).

Por otro lado, para comprobar la interacción de ARF con STAT6 realizamos estudios de co-inmunoprecipitación. Como los efectos de ARF los veíamos sobre STAT6 endógeno, continuamos trabajando con éste y realizamos transfecciones en células Hek293 solamente con p19ARF. Los resultados mostraron que al inmunoprecipitar p19ARF se detectaba STAT6; y a la inversa, cuando inmunoprecipitábamos con STAT6 detectábamos p19ARF aunque de una forma sutil (Fig.r.25D-E). En los extractos totales de estas muestras se puede comprobar de nuevo que, cuando revelamos con un anticuerpo frente a STAT6 los niveles de esta proteína disminuyen en presencia de ARF (Fig.r.25D-E). Aunque serían necesarios realizar estudios de proteómica para identificar de una forma precisa los complejos que se forman y mutaciones dirigidas para afirmar que p19ARF interacciona con STAT6 físicamente, los resultados sugieren que ARF podría estar interaccionando con STAT6, regulándolo de forma negativa.



**Figura r.25. ARF regula de forma negativa a STAT6. A-B)** Células Hek293 fueron transfectadas con 10  $\mu$ g totales de DNA: 10  $\mu$ g de plásmido vacío o 10  $\mu$ g de la construcción de p19ARF. La localización subcelular de p19ARF (en rojo) se estudió mediante microscopía confocal (A). Se realizaron extractos totales de proteínas y la expresión de STAT6 se estudió mediante Western blot (B). **C)** La expresión basal de STAT6 (en verde) en macrófagos peritoneales WT o ARF<sup>-/-</sup> se estudió mediante microscopía confocal. **D-E)** Células Hek293 fueron transfectadas con 10  $\mu$ g totales de DNA; bien con el plásmido vacío como control negativo (-) o con la construcción de p19ARF. Se realizaron co-inmunoprecipitaciones con p19ARF (D) o con STAT6 (E), así como extracto total, y se determinó mediante Western blot la presencia de STAT6 y p19ARF en ambos casos. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot y la inmunofluorescencia, o la media + DE de tres experimentos independientes. Los gráficos que acompañan al Western blot muestran los valores de intensidad relativa de las proteínas en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de  $\beta$ -actina y representados como la media + DE (n=3). \*P<0,05.

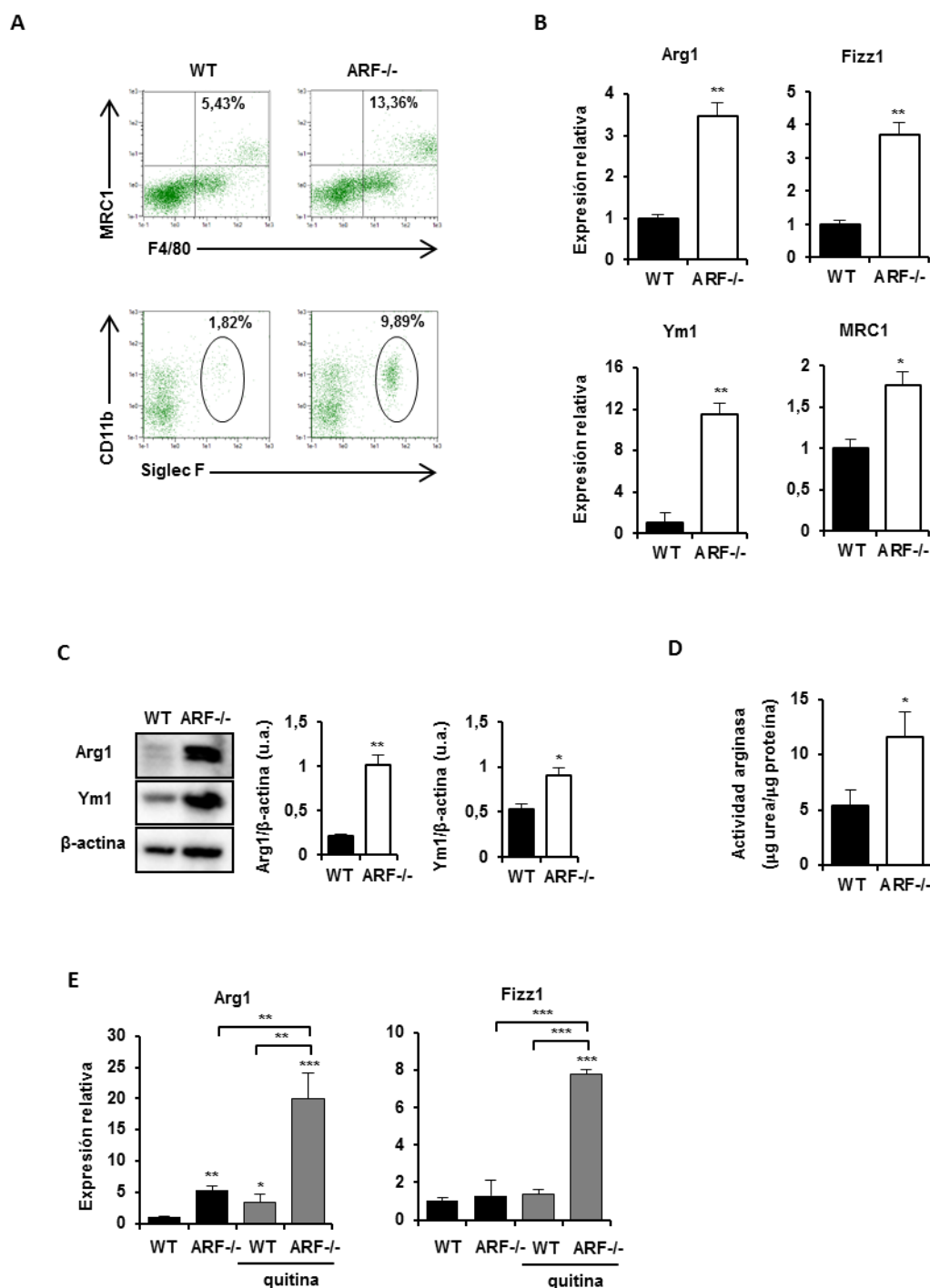
### 3. RELEVANCIA FISIOLÓGICA DE ARF EN MODELOS DE ACTIVACIÓN M2

#### 3.1 ANIMALES DEFICIENTES EN ARF PRESENTAN UNA POLARIZACIÓN ALTERNATIVA EXACERBADA EN UN MODELO *IN VIVO* DE POLARIZACIÓN M2 INDUCIDO POR QUITINA

Para determinar la relevancia fisiológica del déficit de ARF en la activación alternativa de los macrófagos, estudiamos su papel en un modelo de activación *in vivo* del fenotipo M2, basado en la administración intraperitoneal de quitina. Como hemos comentado anteriormente, la quitina es un polímero glucídico presente en helmintos, artrópodos y hongos [114], que induce el reclutamiento de macrófagos y una polarización alternativa de los mismos de forma dependiente de IL-4 [12, 123], acompañado de un aumento en el número de eosinófilos [114, 123].

Administramos quitina intraperitonealmente y 48 h después de la inyección analizamos las poblaciones del exudado peritoneal mediante citometría de flujo. Pudimos comprobar que la población de macrófagos M2 (F4/80<sup>+</sup> / MRC1<sup>+</sup>) era mayor en los animales ARF<sup>-/-</sup>, y que además también presentaban una población de eosinófilos (CD11b<sup>+</sup> / SiglecF<sup>+</sup>) más numerosa que los animales WT (Fig.r.26A). Al analizar la expresión de genes M2 mediante qPCR observamos una mayor expresión de Arg1, Fizz1, Ym1 y MRC1 en el exudado procedente de los animales ARF<sup>-/-</sup> en comparación con los WT (Fig.r.26B). Además, tanto los niveles proteicos de arginasa 1 como su actividad enzimática también se encontraban incrementados en los animales ARF<sup>-/-</sup> (Fig.r.26C).

Puesto que la presencia de macrófagos M2 está adquiriendo una gran relevancia en enfermedades respiratorias [10, 11], extrajimos los pulmones de dichos animales y analizamos la expresión de los marcadores M2, Arg1 y Fizz1, en tejido completo. Pudimos comprobar que, los niveles de dichos genes ya se encontraban aumentados en los pulmones de los animales ARF<sup>-/-</sup> de forma basal, pero las diferencias se hacían mucho más evidentes cuando se les administraba la quitina intraperitonealmente (Fig.r.26D). Estos resultados confirmaban la importancia de ARF en la polarización de los macrófagos e indicaban que el déficit en este gen podría estar jugando un papel fundamental en la regulación de la polarización de los macrófagos en procesos patológicos relacionados con una respuesta inmunitaria de tipo Th2, como podría ser la infección por helmintos, procesos alérgicos o fibrosis pulmonar.

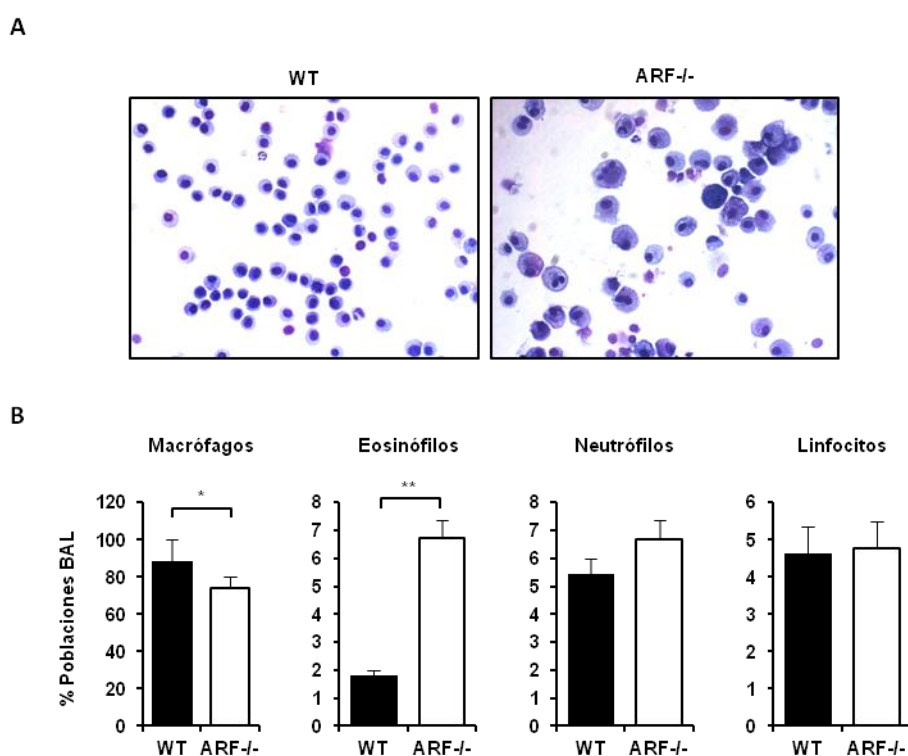


**Figura r.26.** Los animales deficientes en ARF presentan un mayor grado de polarización M2 en un modelo de administración de quitina. Ratones WT y ARF<sup>-/-</sup> fueron inyectados i.p. con 800 ng de quitina. El exudado peritoneal se recolectó y analizó 48 h después de la inyección. **A)** Mediante citometría de flujo se determinó la población de macrófagos M2 (F4/80<sup>+</sup>/MRC1<sup>+</sup>) y el reclutamiento de eosinófilos (CD11b<sup>+</sup>/SiglecF<sup>+</sup>). En el cuadrante correspondiente se indica el porcentaje de células. **B)** La inducción de genes asociados a una polarización M2 (Arg1, Fizz1, Ym1 y MRC1) fueron evaluados mediante qPCR. **C)** Los niveles de proteína de Arg1 e Ym1 se determinaron mediante Western blot. **D)** La actividad arginasa se determinó mediante la producción de urea. **E)** La expresión de mRNA de Arg1 y Fizz1 en pulmón se determinó mediante qPCR. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de Western blot o la media + DE de tres experimentos independientes. Los gráficos que acompañan al Western blot muestran los valores de intensidad relativa de las proteínas en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de β-actina y representados como la media + DE (n=3). \*P<0,05, \*\*P<0,01, y \*\*\*P<0,001 con respecto a la misma condición del grupo control (WT) o con respecto a las condiciones que se indiquen.



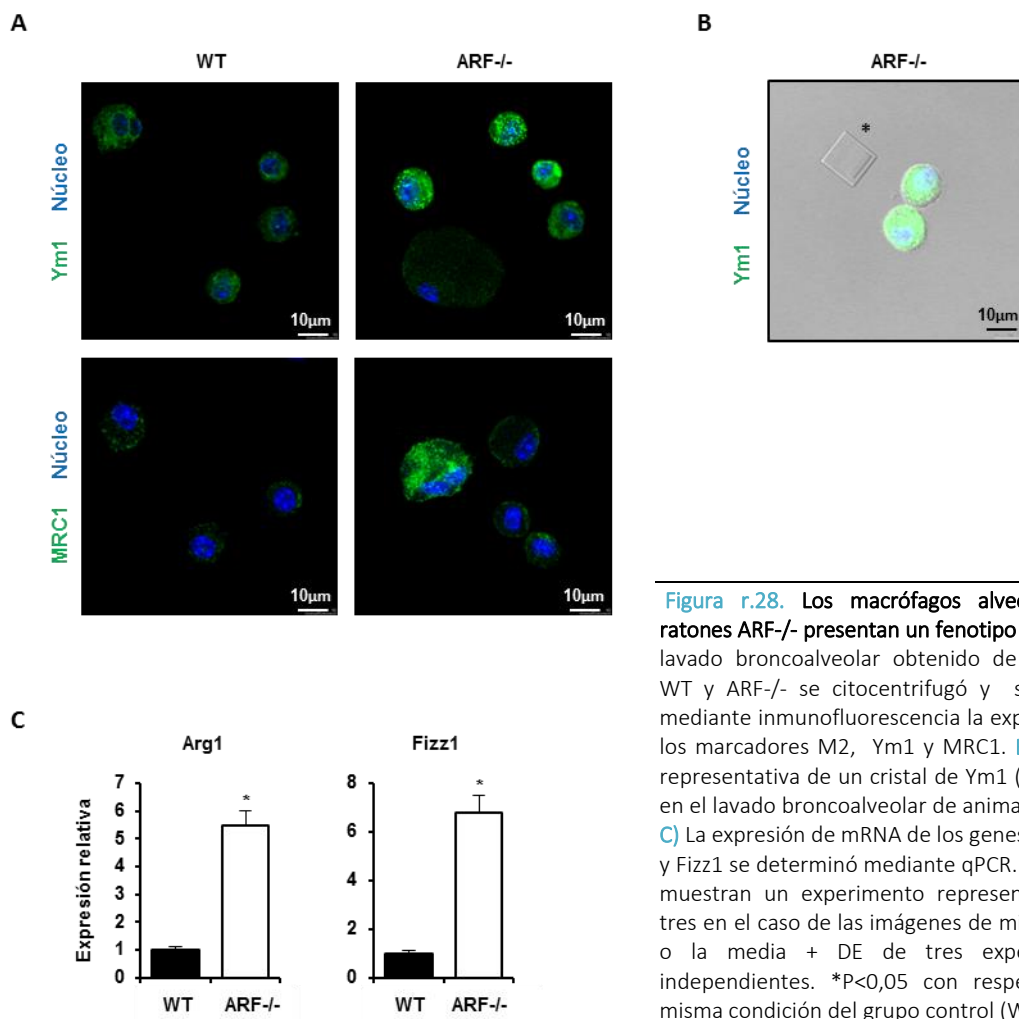
### 3.2 LOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE LOS ANIMALES ARF-/- PRESENTAN UNA MAYOR POLARIZACIÓN M2

En vista de los resultados obtenidos hasta ahora, en los que observamos una mayor polarización M2 de los macrófagos ARF-/- tanto peritoneales como derivados de médula ósea; quisimos explorar si otras poblaciones de macrófagos cuyo origen no fuese principalmente hematopoyético, también presentaban estos cambios en el fenotipo. Nos centramos en los macrófagos alveolares ya que, según se ha descrito recientemente, parecen tener origen embrionario [51]. Realizamos lavados broncoalveolares de los animales WT y ARF-/- y mediante una tinción diferencial panóptica rápida analizamos las diferentes poblaciones presentes en el lavado broncoalveolar (Fig.r.27). Observamos que la población mayoritaria estaba constituida por macrófagos en torno a un 85% en el caso de los animales WT y un 75% en los ARF-/. Con respecto a la población de eosinófilos, los animales ARF-/- presentaban un 7% mientras que los animales WT solo un 2%. En ambos casos, las diferencias entre las poblaciones de macrófagos y eosinófilos presentes en los animales WT y ARF-/- resultaron ser estadísticamente significativas. Por el contrario, no encontramos diferencias en las poblaciones de neutrófilos y linfocitos entre los animales WT y ARF-/- (alrededor de un 5% eran neutrófilos y un 4% linfocitos).



**Figura r.27.** Análisis de las poblaciones obtenidas del lavado broncoalveolar de animales WT y ARF-/- . **A)** El lavado broncoalveolar obtenido de animales WT y ARF-/-, se sometió a una citocentrifugación y se realizó una tinción panóptica rápida. **B)** Contaje de las distintas poblaciones del BAL de animales WT y ARF. \* $P < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$

La mayor presencia de eosinófilos en el BAL procedente de los animales ARF<sup>-/-</sup> parecía sugerir un mayor estado de polarización M2, por lo que mediante microscopía confocal, analizamos la presencia de marcadores M2 como Ym1 y MRC1. Observamos que en el lavado broncoalveolar de los animales deficientes en ARF existía un mayor número de células positivas para ambos marcadores (Fig.r.28A). Además, pudimos detectar formaciones de cristales (Fig.r.28B), posiblemente de Ym1, muy similares a los que han sido descritos previamente por otros autores en modelos relacionados con activación M2. Así, Rauh y colaboradores describieron la presencia de cristales hexagonales de Ym1 en el BAL de animales SHIP<sup>-/-</sup> [113], similares a los encontrados por Nan Chi y colaboradores en el peritoneo de animales infectados con *Trichinella spiralis* [61]. Finalmente, cuando analizamos mediante qPCR los niveles de expresión de otros marcadores M2 como Arg1 y Fizz1, también observamos una mayor expresión en los animales ARF<sup>-/-</sup> (Fig.r.28C).



**Figura r.28. Los macrófagos alveolares de ratones ARF<sup>-/-</sup> presentan un fenotipo M2.** **A)** El lavado broncoalveolar obtenido de animales WT y ARF<sup>-/-</sup> se citocentrifugó y se analizó mediante inmunofluorescencia la expresión de los marcadores M2, Ym1 y MRC1. **B)** Imagen representativa de un cristal de Ym1 (asterisco) en el lavado broncoalveolar de animales ARF<sup>-/-</sup>. **C)** La expresión de mRNA de los genes M2 Arg1 y Fizz1 se determinó mediante qPCR. Los datos muestran un experimento representativo de tres en el caso de las imágenes de microscopía o la media + DE de tres experimentos independientes. \*P<0,05 con respecto a la misma condición del grupo control (WT).

## 4. PAPEL DE ARF EN LA REGULACIÓN DEL DESARROLLO TUMORAL A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS

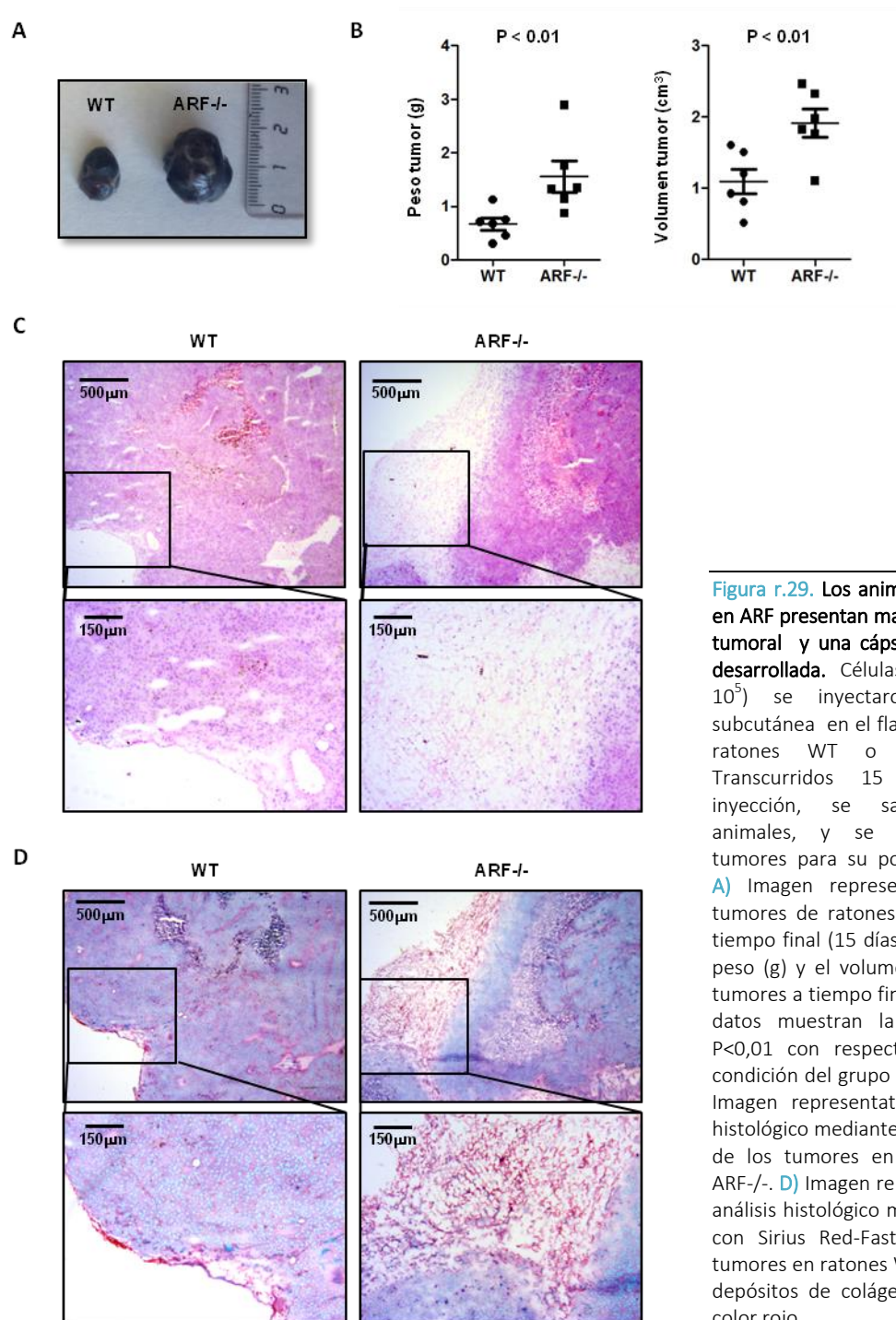
### 4.1 EL DÉFICIT EN ARF PROMUEVE EL CRECIMIENTO TUMORAL Y LA INFILTRACIÓN DE TAMs EN UN MODELO DE IMPLANTE TUMORAL SUBCUTÁNEO DE CÉLULAS DE MELANOMA B16F10

Los resultados anteriores junto con los estudios previos del laboratorio demuestran que la ausencia de ARF provoca una respuesta inflamatoria deficitaria, e induce una polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2 [56, 146]. Además, los estudios *in vivo* (modelos de quitina) y el estudio del fenotipo pulmonar corroboran la importancia de este gen en la regulación de la polarización de los macrófagos. En base a estos hechos, nos preguntamos si ARF también podría desempeñar un papel clave en la regulación del microambiente tumoral, donde se ha descrito que los macrófagos M2 juegan un papel esencial facilitando la progresión del tumor. Para ello se utilizaron ratones WT y ARF<sup>-/-</sup> y se les indujo la formación de un tumor sólido mediante la inyección subcutánea de células tumorales de melanoma B16F10. Transcurridos 15 días de la inoculación, se sacrificaron los animales y se extrajeron los tumores para su análisis histológico. Tal y como esperábamos, la ausencia de ARF provocó un incremento del crecimiento tumoral en comparación con los animales WT (Fig.r.29A-B). El análisis histológico mediante tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E) de los cortes de tumores mostró la existencia de una cápsula fibrosa alrededor del tumor que, mientras que en los animales WT era bastante fina, en los animales ARF<sup>-/-</sup> era más gruesa y con unos bordes bien definidos alrededor del parénquima tumoral (Fig.r.29C). Mediante tinción con Sirius Red-Fast Green que permite detectar la presencia de colágeno (rojo) pudimos comprobar que, la cápsula fibrosa de los animales ARF<sup>-/-</sup> está compuesta por abundante tejido conectivo y depósitos de colágeno en comparación con los animales WT (Fig.r.29D).

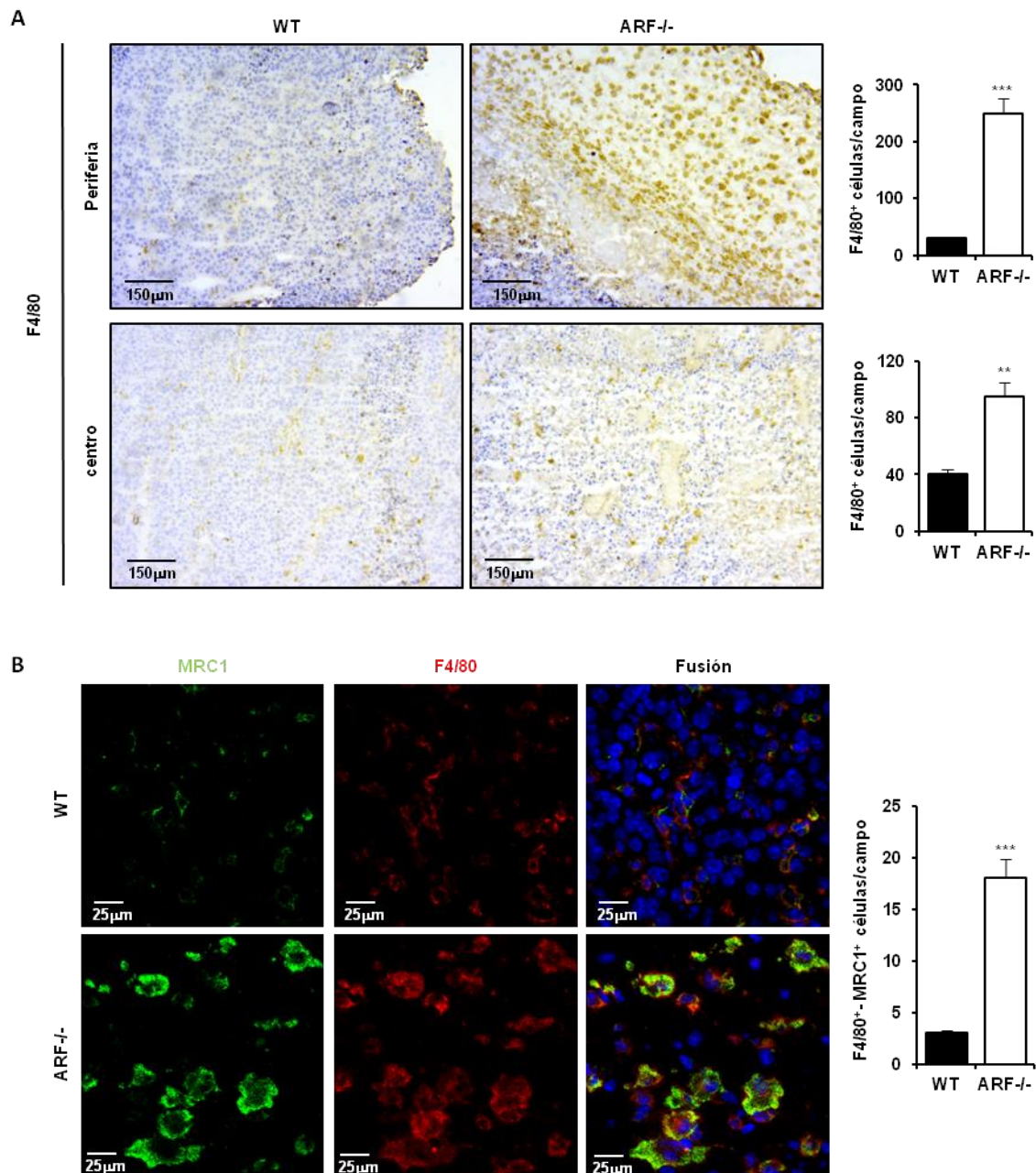
Posteriormente, evaluamos el contenido de macrófagos en los tumores mediante tinción inmunohistoquímica usando el marcador F4/80. Aunque se observó infiltración de macrófagos en ambos casos, el número de macrófagos presentes tanto en el centro como en la periferia de los tumores de los animales ARF<sup>-/-</sup> fue mayor comparado con los animales WT (Fig.r.30A).

Se ha descrito que los TAMs expresan un perfil de marcadores similar al de los macrófagos M2, incluyendo entre ellos la expresión de MRC1 [106]. Para comprobar si el mayor grado de infiltración de macrófagos observado en los tumores de los animales ARF<sup>-/-</sup> se correspondía con una mayor presencia de TAMs, se analizaron los cortes mediante

inmunofluorescencia. La tinción conjunta con MRC1 y F4/80 reveló que la expresión de MRC1 se detectaba exclusivamente en macrófagos y no en otros tipos celulares; y que los tumores de los animales ARF<sup>-/-</sup> tenían más infiltrado de células dobles positivas (MRC1 y F4/80) que los tumores de los animales WT (Fig.r.30B). Estos datos sugieren que el déficit de ARF aumenta el reclutamiento de macrófagos en el tumor y favorece su polarización hacia un fenotipo M2.



**Figura r.29.** Los animales deficientes en ARF presentan mayor crecimiento tumoral y una cápsula fibrosa más desarrollada. Células B16F10 ( $3 \times 10^5$ ) se inyectaron de forma subcutánea en el flanco derecho de ratones WT o ARF<sup>-/-</sup> (n=6). Transcurridos 15 días de la inyección, se sacrificaron los animales, y se extrajeron los tumores para su posterior análisis. **A)** Imagen representativa de los tumores de ratones WT y ARF<sup>-/-</sup> a tiempo final (15 días) **B)** Se indica el peso (g) y el volumen (cm<sup>3</sup>) de los tumores a tiempo final (15 días). Los datos muestran la media + DE. P<0,01 con respecto a la misma condición del grupo control (WT). **C)** Imagen representativa del análisis histológico mediante tinción con H-E de los tumores en ratones WT y ARF<sup>-/-</sup>. **D)** Imagen representativa del análisis histológico mediante tinción con Sirius Red-Fast Green de los tumores en ratones WT y ARF<sup>-/-</sup>. Los depósitos de colágeno se tiñen de color rojo.



**Figura r.30.** El déficit en ARF aumenta el reclutamiento de macrófagos y la activación hacia un fenotipo M2. Células B16F10 ( $3 \times 10^5$ ) se inyectaron de forma subcutánea en el flanco derecho de ratones WT o ARF<sup>-/-</sup> (n=6). Transcurridos 15 días de la inyección, se sacrificaron los animales, y se extrajeron los tumores para su posterior análisis. **A)** Análisis inmunohistoquímico de tumores WT y ARF<sup>-/-</sup> en el que se marcaron los macrófagos con F4/80 (marrón). Se hizo un conteo de los macrófagos en 5 campos escogidos al azar. Los datos muestran una imagen representativa (izquierda) y la media + DE de tres experimentos independientes con 4 animales en cada uno. **B)** Inmunofluorescencia en la que se marcó de forma conjunta: los macrófagos con F4/80 (rojo), la adquisición de un fenotipo M2 con MRC1 (verde) y los núcleos con DAPI (azul). El número de células dobles positivas (F4/80 y MRC1) se contaron en 5 campos escogidos al azar de cada tumor. Los datos muestran una imagen representativa (izquierda) o la media +DE (n=6). \*\*P<0,01, y \*\*\*P<0,001.

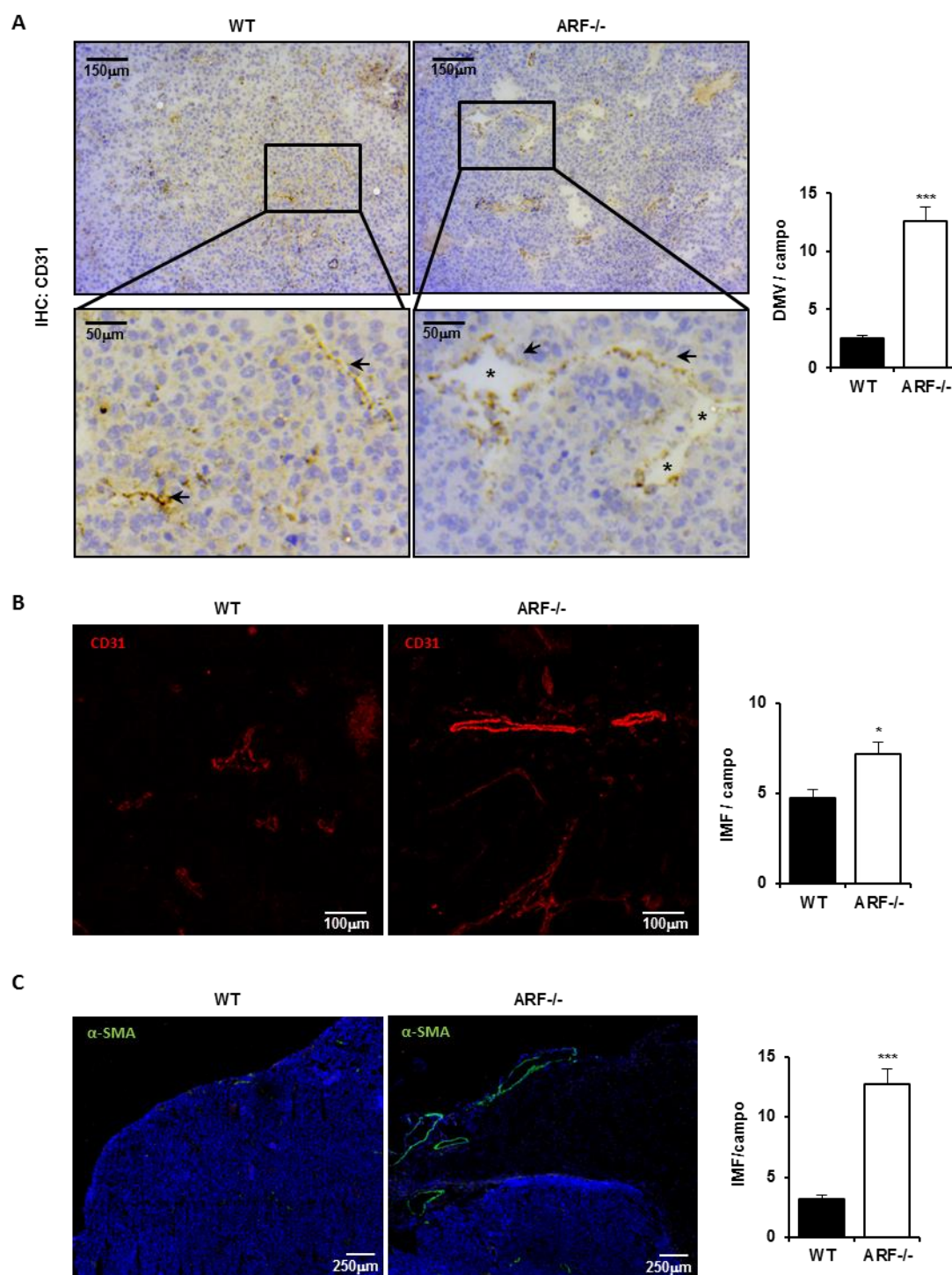


## 4.2 EL DÉFICIT DE ARF PROMUEVE ANGIOGÉNESIS

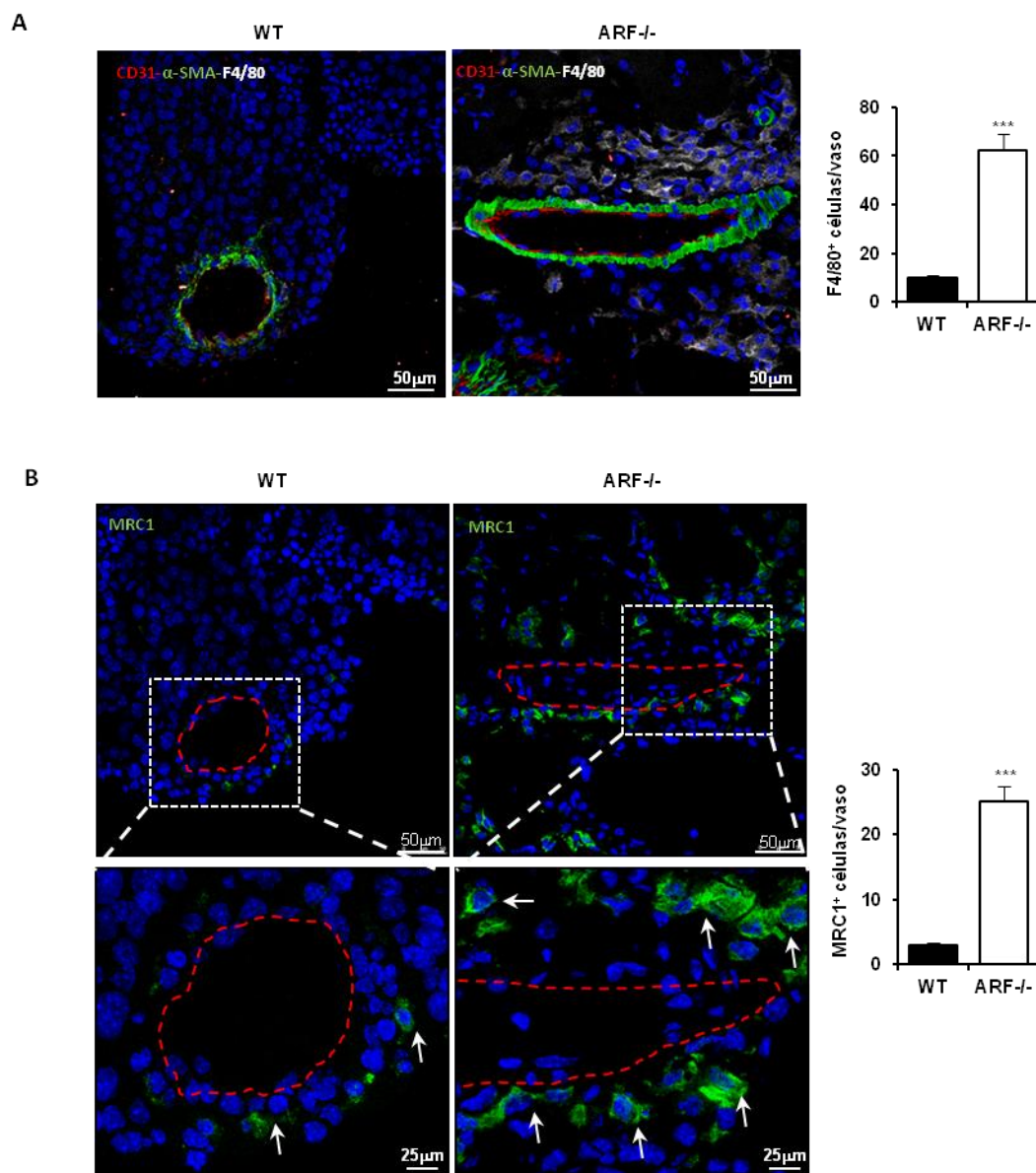
La angiogénesis juega un papel muy importante en la progresión tumoral. Sin la vasculatura adecuada, habría una limitación de oxígeno y nutrientes que impediría el crecimiento del tumor. Junto a las células tumorales, los TAMs también pueden promover la angiogénesis tumoral [131, 136]. Se ha descrito que ARF modula la formación de vasos sanguíneos en los tumores a través de la inhibición de la expresión de VEGF [41, 70]. Además, ARF juega un papel esencial en la reorganización vascular en los últimos estadios del desarrollo del ojo en ratón [159]. Estos hechos nos llevaron a estudiar si el crecimiento tumoral y la infiltración de macrófagos que observábamos en ratones ARF<sup>-/-</sup> se correlacionaba con una mayor angiogénesis en los tumores.

Analizamos la vascularización del tumor mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia utilizando el marcador de endotelio CD31 (PECAM-1). El análisis con CD31 mostró que la densidad vascular en los tumores de animales ARF<sup>-/-</sup>, era significativamente mayor si la comparábamos con los tumores de animales WT (Fig.r.31A-B). Un hecho interesante es que la mayoría de los vasos en los tumores de animales ARF<sup>-/-</sup> presentaban un lumen patente y bien organizado. Además, para evaluar el grado de madurez y desarrollo de los nuevos vasos sanguíneos, analizamos la presencia de músculo liso vascular mediante el marcador de la actina de músculo ( $\alpha$ -SMA) [167]. En este caso se observó un aumento significativo del número de células que expresaban  $\alpha$ -SMA dispuestas en las estructuras vasculares de los tumores de animales ARF<sup>-/-</sup> (Fig.r.31C).

Para analizar en más detalle la estructura de esta nueva vasculatura, los cortes de los tumores se marcaron conjuntamente con CD31 y  $\alpha$ -SMA, analizándose mediante microscopia confocal. En la figura r.32A se muestra que los tumores de los animales ARF<sup>-/-</sup> presentaban mayor número de células positivas para  $\alpha$ -SMA (verde) situadas alrededor de los nuevos vasos (identificados con el marcaje de CD31, rojo). Además, las células del músculo liso formaban una estructura más densa y compacta, lo que indicaba la existencia de un mayor grado de organización y madurez (Fig.r.32A). Por otro lado, cuando analizamos la presencia de macrófagos en los tumores, mediante el marcaje con F4/80 (blanco), pudimos comprobar que en las áreas adyacentes a los vasos, el infiltrado de macrófagos en los animales ARF<sup>-/-</sup> era mucho mayor que en animales WT (Fig.r.32A). Finalmente, mediante tinción en cortes seriados con el marcador de polarización M2 MRC1, demostramos que los macrófagos que parecen estar interactuando con el lecho vascular son macrófagos M2 (Fig.r.32B).



**Figura r.31.** El déficit en ARF promueve angiogénesis. Células B16F10 ( $3 \times 10^5$ ) se inyectaron de forma subcutánea en el flanco derecho de ratones WT o ARF<sup>-/-</sup> (n=6). Transcurridos 15 días de la inyección, se sacrificaron los animales, y se extrajeron los tumores para su posterior análisis. **A)** Análisis de la densidad media vascular (DMV) de tumores WT y ARF<sup>-/-</sup> mediante inmunohistoquímica. Se marcó el endotelio con CD31 (marrón) y se cuantificó el número de vasos en 5 campos escogidos al azar de cada tumor. Se definió un vaso sanguíneo como un grupo discreto de células CD31 positivas, sin necesidad de la presencia de un lumen (flechas). Los datos muestran una imagen representativa (izquierda) y la media + DE (n=6). La presencia de lumen en los vasos (asteriscos) indica una vasculatura más madura. **B-C)** Análisis mediante microscopía confocal de la expresión de CD31 (B) o α-SMA (C). La intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada marcador se cuantificó con el software Image J en 5 campos escogidos al azar de cada tumor. Los datos muestran la media +DE (n=6). \*P<0,05 y \*\*\*P<0,001.



**Figura r.32. El aumento de angiogénesis está relacionado con un mayor grado de infiltración macrófagos y polarización M2 de los mismos.** Células B16F10 ( $3 \times 10^5$ ) se inyectaron de forma subcutánea en el flanco derecho de ratones WT o ARF<sup>-/-</sup> (n=6). Transcurridos 15 días de la inyección, se sacrificaron los animales, y se extrajeron los tumores para su posterior análisis. **A)** Inmunofluorescencia de CD31 (rojo),  $\alpha$ -SMA (verde) y F4/80 (blanco) en secciones de tumores de animales WT y ARF<sup>-/-</sup> con los núcleos contrateñidos con DAPI (azul). El número de macrófagos asociados a vasos maduros (aquellos que tienen la capa endotelial rodeada de músculo liso marcado con  $\alpha$ -SMA) se cuantificó en 5 campos escogidos al azar de cada tumor **B)** Inmunofluorescencia de MRC1 (verde) en secciones consecutivas a las inmunofluorescencias anteriores. Los núcleos se contrateñieron con DAPI (azul). Con la línea discontinua roja se marca la posición del vaso sanguíneo y con flechas blancas los macrófagos M2. El número de células positivas para MRC1 asociadas a vasos maduros se cuantificó en 5 campos escogidos al azar de 10 secciones de tumores independientes. Los datos se muestran como la media + DE (n=6). \*\*\*P<0.001.

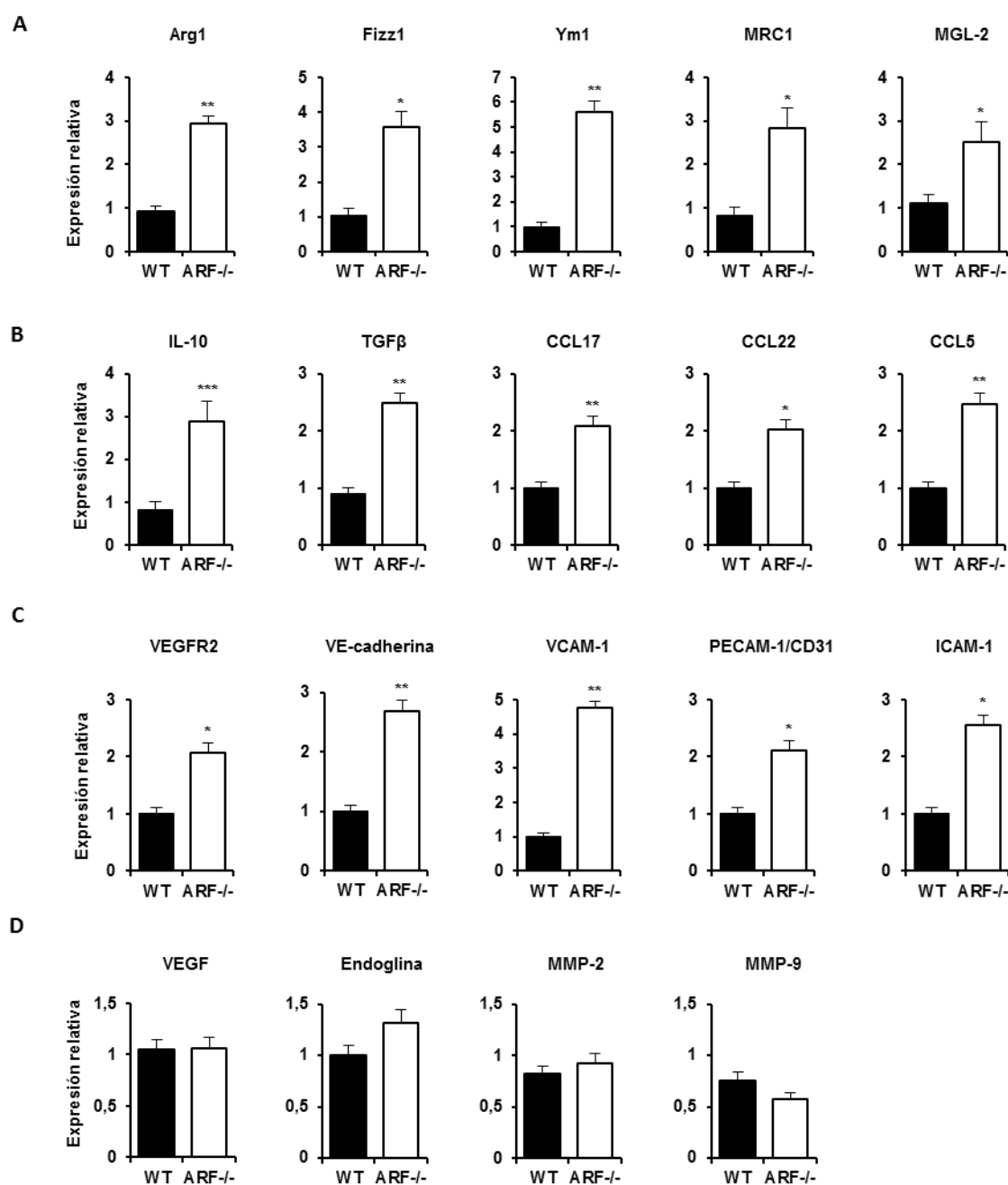


### 4.3 EL DÉFICIT DE ARF MODIFICA RUTAS MOLECULARES QUE REGULAN LA RESPUESTA INMUNE TUMORAL Y LA ANGIOGÉNESIS.

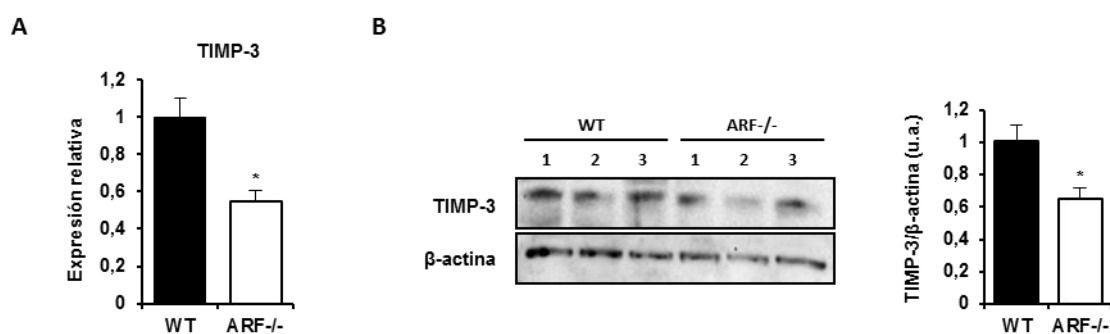
Para corroborar los resultados obtenidos en los modelos *in vivo*, además de los estudios histológicos, analizamos la expresión de varios marcadores M2 en los tumores procedentes de los animales WT y ARF<sup>-/-</sup>. Observamos que Arg1, Fizz1, Ym1, MRC1 y MGL-2 tenían una mayor expresión en los tumores de los ratones ARF<sup>-/-</sup> en comparación con los WT, confirmando así la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2 (Fig.r.33A). Además, cuando estudiamos una serie de citoquinas y quimioquinas que se han relacionado con la activación alternativa de los macrófagos, comprobamos que los niveles de mRNA de IL-10, TGFβ, CCL17, CCL22 y CCL5 también se encontraban aumentados en los tumores de ratones ARF<sup>-/-</sup> (Fig.r.33B). Para intentar identificar los mecanismos involucrados en el aumento de la respuesta angiogénica de los tumores de B16F10 implantados en ratones ARF<sup>-/-</sup>, analizamos mediante qPCR la expresión de un conjunto de genes relacionados con angiogénesis. Como se muestra en la figura r.33C los niveles de mRNA del receptor de VEGF 2 (VEGFR2), de la cadherina vascular endotelial (VE-cadherin) y de moléculas de adhesión como VCAM-1, PECAM-1/CD31 e ICAM-1 aumentaron significativamente en los tumores de ratones ARF<sup>-/-</sup> si los comparábamos con los ratones WT (Fig.r.33C). Sin embargo, otros factores que modulan la angiogénesis y la migración de células endoteliales como VEGF y endoglina se mantenían sin cambios (Fig.r.33D).

Se ha descrito que ARF inhibe la angiogénesis estimulando la expresión del inhibidor de metaloproteínasa TIMP-3 [169], y que esta proteína es capaz de inhibir VEGFR2 y moléculas de adhesión como VE-cadherina o VCAM-1 [109, 134]. Con el fin de profundizar en el mecanismo molecular por el que los tumores de los animales ARF<sup>-/-</sup> tienen una mayor densidad vascular, evaluamos los niveles de expresión de TIMP-3. Los datos mostraron que la expresión de TIMP-3, tanto de mRNA como de proteína, era menor en los tumores de animales ARF<sup>-/-</sup> en comparación con los WT (Fig.r.34A-B).

Estos resultados sugieren que la pérdida de ARF podría conducir a la activación de un programa genético que regule la respuesta inmune, especialmente promoviendo la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 y favoreciendo la angiogénesis.



**Figura r.33.** Efectos del déficit de ARF en la expresión de marcadores M2 y de factores proangiogénicos. Células B16F10 ( $3 \times 10^5$ ) se inyectaron de forma subcutánea en el flanco derecho de ratones WT o ARF<sup>-/-</sup> (n=6). Transcurridos 15 de la inyección, se sacrificaron los animales, se extrajeron los tumores y se procesaron para aislar el RNA. Se cuantificó mediante qPCR la expresión de mRNA de **A)** marcadores M2 (Arg1, Fizz1, Ym1, MRC1, MGL-2), **B)** citoquinas y quimioquinas (IL-10, TGFβ, CCL17, CCL22, CCL5), **C-D)** marcadores relacionados con angiogénesis (VEGFR2, VE-cadherina, VCAM-1, PECAM-1/CD31, ICAM-1, VEGF, Endoglin, MMP-2 y MMP-9). Los datos muestran la media + DE (n=6) \*P<0,05, \*\*P<0,01, y \*\*\*P<0,0001.

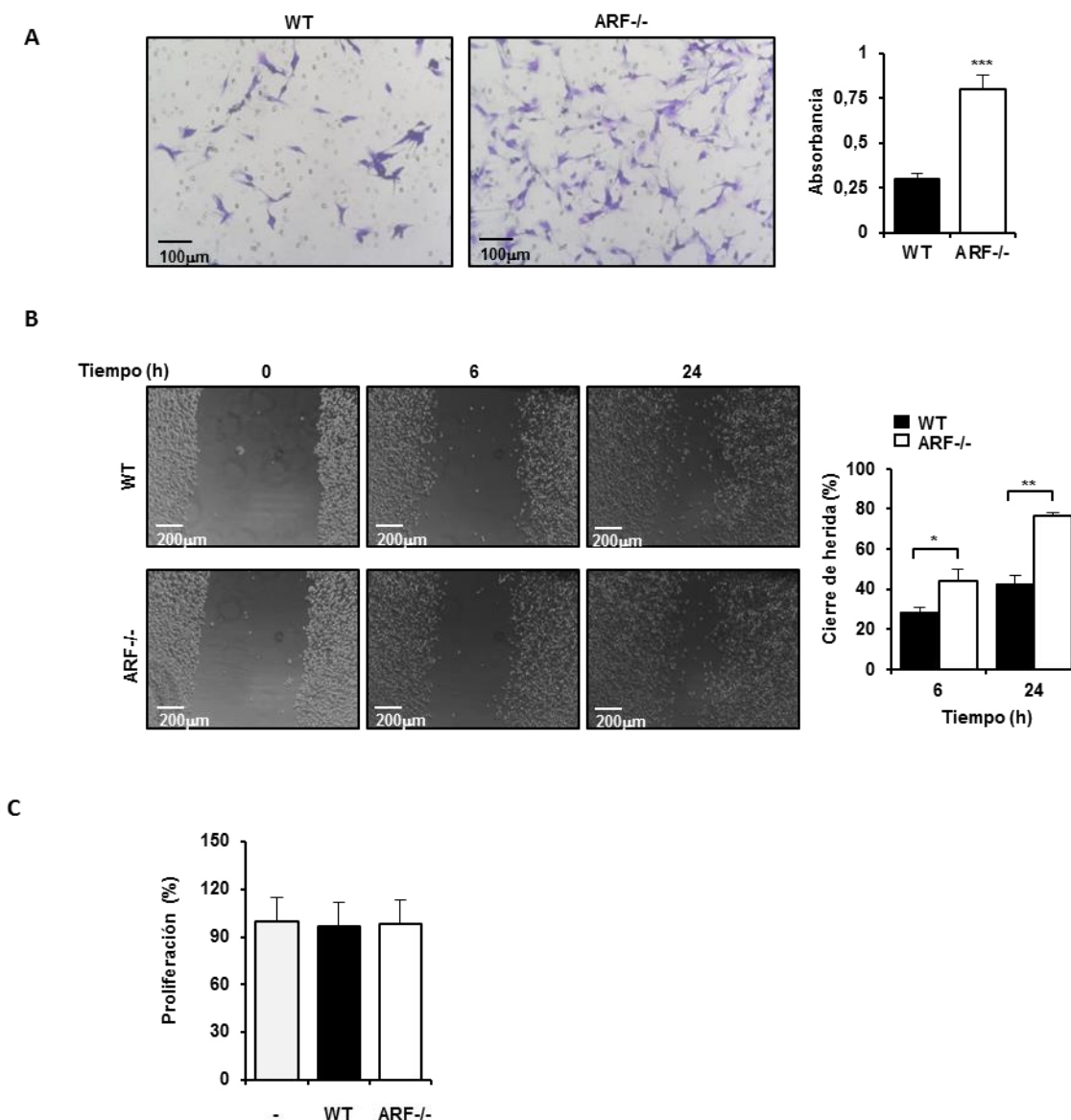


**Figura r.34. Efectos del déficit de ARF en la expresión del inhibidor de angiogénesis TIMP-3.** **A)** El nivel de inducción de mRNA de TIMP-3 en tumores de ratones WT y ARF<sup>-/-</sup>, se cuantificó mediante qPCR. Los datos se muestran como la media +DE (n=6) **B)** El nivel de proteína de TIMP-3 en los tumores de ratones WT y ARF<sup>-/-</sup>, se cuantificó mediante Western blot. Los números (1,2 y 3) indican diferentes tumores del mismo grupo. El gráfico que acompaña al Western blot muestra los valores de intensidad relativa de la proteína en unidades arbitrarias (u.a.), normalizados con los niveles de β-actina y representados como la media + DE (n=3). \*P<0,05.

#### 4.4 LOS MACRÓFAGOS ARF<sup>-/-</sup> AUMENTAN LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES *IN VITRO*

Los resultados obtenidos en los modelos de tumores *in vivo*, indican que la ausencia de ARF podría jugar un papel muy importante en el crecimiento del tumor no solo modificando las propiedades de las células tumorales sino modulando el microambiente tumoral a través de la polarización M2 de los macrófagos. Para comprobar si ARF regula la migración de las células tumorales a través de la polarización de macrófagos, realizamos un abordaje experimental que intenta imitar el microambiente tumoral, consistente en el co-cultivo de células B16F10 con macrófagos WT o ARF<sup>-/-</sup> separadas por una membrana semipermeable. El número de células tumorales que migraron a través de los poros de la membrana fue mucho mayor en presencia de macrófagos ARF<sup>-/-</sup> que de macrófagos WT (Fig.r.35A). Además, cuando llevamos a cabo un ensayo de cierre de herida en las mismas condiciones, observamos que las células B16F10 migraban más, permitiendo un cierre de herida más rápido en presencia de los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> (Fig.r.35B).

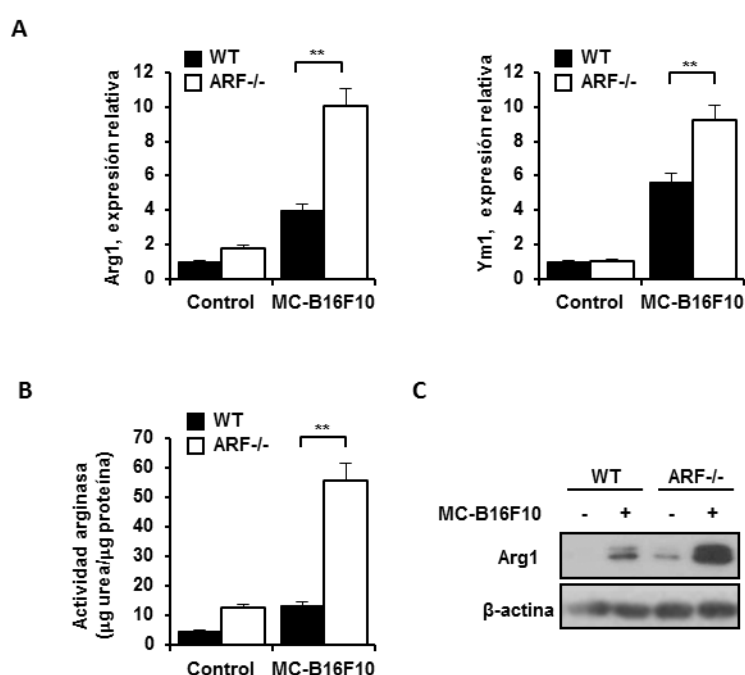
En cuanto a la proliferación de las células tumorales, pudimos comprobar mediante un ensayo de MTT que la proliferación de las mismas no se veía comprometida en el co-cultivo con macrófagos, y que tampoco había diferencias significativas entre un co-cultivo con macrófagos WT o ARF<sup>-/-</sup> (Fig.r.35C). Estos resultados demostraban que los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> estimulan la migración de las células tumorales sin afectar significativamente a la proliferación de las mismas.



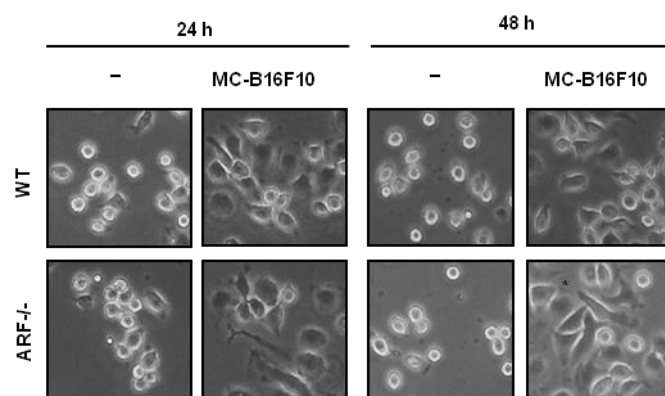
**Figura r.35. Los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> promueven la migración de células tumorales B16F10.** **A)** Ensayo de migración en un sistema de co-cultivo. Las células B16F10 se sembraron en la cámara superior y los macrófagos peritoneales obtenidos de animales WT o ARF<sup>-/-</sup> en la cámara inferior, separados por una membrana semipermeable con poros de 8 µm de diámetro que permite el paso de las células. Después de 24 horas, los insertos se tiñeron con 0,5% de cristal violeta, y las células que no migraron se eliminaron de la parte superior de la membrana. Se realizaron fotografías al azar, y la cantidad de células B16F10 que habían migrado a la parte inferior de la membrana se calculó disolviendo el cristal violeta y midiendo la absorbancia a 545nm. **B)** Ensayos de cierre de herida. Las células B16F10 se sembraron en la cámara inferior, se realizó la herida y se dispusieron los macrófagos peritoneales obtenidos de animales WT o ARF<sup>-/-</sup> en la cámara superior, separados por una membrana semipermeable en este caso con poros de 0,4 µm que no permite el paso de las células pero sí de las componentes solubles. Se realizaron fotografías de la herida a distintos tiempos y se calculó el porcentaje de cierre de la herida mediante con el software Image J. **C)** La proliferación de las células tumorales B16F10 en presencia de macrófagos peritoneales WT o ARF<sup>-/-</sup> se analizó mediante un ensayo de MTT. Los datos muestran la media + DE de tres experimentos independientes. \*P<0,05, \*\*P<0,01, y \*\*\*P<0,001 con respecto a la misma condición del WT.

## 4.5 LAS CÉLULAS TUMORALES PROMUEVEN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES M2 RELACIONADOS CON FACTORES INMUNOSUPRESORES EN MACRÓFAGOS

Para profundizar en la interacción entre la célula tumoral y los macrófagos, éstos últimos fueron expuestos a medio condicionado de células tumorales B16F10 sin ningún otro estímulo exógeno. Observamos que el medio condicionado de las células B16F10 inducía cambios significativos en la expresión de marcadores M2 como Arg1 e Ym1 tanto en macrófagos WT como ARF<sup>-/-</sup> (Fig.r.36A), y que la actividad arginasa y los niveles de proteína de Arg1 se encontraban también aumentados (Fig.r.36B). Sin embargo, la activación M2 que sufrían los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> con el medio condicionado, era mucho más pronunciada que los macrófagos WT, sugiriendo que el ambiente tumoral promueve una polarización M2 más marcada en macrófagos deficientes de ARF. Además, el medio condicionado indujo cambios morfológicos en los macrófagos, caracterizados por un fenotipo más alargado en el caso de los macrófagos ARF (Fig.r.37), morfología que ha sido relacionada con un fenotipo M2 [89, 151].



**Figura r.36** El medio condicionado de células tumorales B16F10 promueve un fenotipo M2 más pronunciado en macrófagos ARF<sup>-/-</sup>. Se aislaron macrófagos peritoneales de animales WT y ARF<sup>-/-</sup>, cultivándose en presencia de medio condicionado de células B16F10 (MC-B16F10). **A**) La expresión de mRNA de Arg1 e Ym1 se determinó mediante qPCR tras 6 h de incubación. **B**) Tras 24h de incubación se determinó la actividad arginasa. **C**) Los macrófagos WT y ARF<sup>-/-</sup> se trataron como en B) y se determinó la expresión proteica de Arg1 mediante Western blot. Se muestra una imagen de Western blot representativa de tres experimentos. Los datos se muestran como la media +DE de tres experimentos independientes. \*\*P<0,01 con respecto a la misma condición del WT.




**Figura r.37.** El medio condicionado de células tumorales B16F10 promueven cambios morfológicos relacionados con un fenotipo M2 en macrófagos ARF<sup>-/-</sup>. Se aislaron macrófagos peritoneales de animales WT y ARF<sup>-/-</sup> y fueron expuestos a medio condicionado de células B16F10 (MC-B16F10) durante 24 o 48 h.







The background of the slide is a dense field of microscopic sperm cells, likely from a fish, showing their characteristic oval heads and long, thin tails. The cells are distributed across the entire frame, with a slightly higher concentration in the upper and lower portions. A semi-transparent light blue horizontal band runs across the middle of the image, serving as a backdrop for the title text.

# DISCUSIÓN



Los macrófagos constituyen un eje fundamental en la respuesta inmunitaria innata. Son los principales responsables de mantener la integridad y salud del individuo al elaborar respuestas rápidas y eficaces frente a una enorme variedad de patógenos, a la vez que son capaces de reconocer las células y estructuras propias. Además de su función inmunológica, los macrófagos son claves para mantener la homeostasia de los tejidos del organismo [47, 78, 98].

Los estudios referentes a la biología de los macrófagos se han incrementado en las últimas décadas. Tanto es así, que los paradigmas clásicos que tienen que ver con su origen y activación están cambiando a pasos agigantados. Esto ha llevado a la comunidad científica a dirigir y aumentar sus esfuerzos, en entender y clasificar este tipo de células. En los últimos años, uno de los principales temas de investigación en la biología de los macrófagos ha sido la polarización de los mismos. Los macrófagos son células plásticas y dinámicas capaces polarizarse hacia un fenotipo proinflamatorio (M1) o antiinflamatorio (M2) en función del microambiente en el que se encuentren [133]. Atendiendo a su estado de activación pueden desempeñar funciones fisiológicas distintas; mientras los macrófagos M1 producen citoquinas proinflamatorias ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 o IL- $1\beta$ ) y ejercen una función principalmente citotóxica y antimicrobiana; los macrófagos M2 se caracterizan por su efectos antiinflamatorios e inmunoreguladores, por promover el remodelado tisular, la eliminación de parásitos y por su actividad protumoral. Es fundamental que exista un balance entre los dos estados de activación (M1 y M2) para mantener una correcta homeostasis, ya que un fenotipo M1 o M2 exacerbado puede desembocar en el desarrollo de numerosas patologías [133]. Por lo tanto, conocer en profundidad los mecanismos moleculares por los que se inducen estos fenotipos es fundamental para poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y mejorar el diagnóstico de estas enfermedades.

En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de la polarización alternativa o M2 de los macrófagos en respuesta a IL-4, describiendo nuevos reguladores de este proceso que parecen desempeñar un papel clave en la regulación de la respuesta inmune. Así, hemos descrito el papel de la quinasa p38 MAPK en la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2, hemos profundizado en los mecanismos moleculares por los que el gen supresor de



tumores ARF es capaz de modular la polarización de macrófagos y hemos explorado algunas de las implicaciones fisiológicas del déficit en ARF en estas células.

Entre las señales que activan la respuesta alternativa de los macrófagos, IL-4 desempeña un papel crucial. En respuesta a IL-4 se ha descrito que los macrófagos son capaces de expresar marcadores típicos M2 como Arg1 [49]. De hecho, nuestros resultados muestran que en macrófagos peritoneales murinos, IL-4 es capaz de inducir no solo la expresión de marcadores M2 clásicos como Arg1, Ym1 y Fizz1; sino también otros genes como MRC1, IRF4, KLF4, SOCS1 y TGM2 cuya activación en respuesta a IL-4 ha sido recientemente descrita en macrófagos tanto de ratón como humanos [87]. Estos datos permiten establecer cierto consenso sobre los genes que pueden ser utilizados como marcadores generales de activación alternativa.

La respuesta a IL-4 está mediada por dos tipos de receptores: de tipo I y de tipo II [72]. En células hematopoyéticas, predomina el receptor de tipo I formado por la cadena IL-4R $\alpha$ , capaz de unirse a IL-4 con gran afinidad, y la cadena  $\gamma$ c (IL-4R $\gamma$ c) común a otros receptores de citoquinas. Este receptor lleva acopladas las quinasas, JAK1 y JAK3, que señalizan a través de STAT6 y PI3K una vez que son activadas por IL-4 [55, 72]. Puesto que algunos marcadores M2 (Arg1, Ym1, Fizz1 e IRF4) son dependientes de la activación de STAT6 [26, 53, 112], hemos examinado la participación del receptor de tipo I y de la señalización a través de la ruta de JAK/STAT6 en la expresión de estos genes en nuestro sistema. El bloqueo de la ruta de señalización mediante un inhibidor farmacológico de JAKs, conduce a una inhibición de la expresión de los genes Arg1, Ym1 y Fizz1 en macrófagos peritoneales estimulados con IL-4, lo que corrobora que dichas quinasas son imprescindibles para la activación de la ruta.

Además de las vías clásicas activadas por IL-4, recientemente se ha propuesto que algunas MAPK podían jugar un papel importante en la ruta de señalización de esta citoquina. Por ejemplo, se ha descrito que IL-4 e IL-13 inducen la fosforilación de ERK y JNK en células de músculo liso en humanos [57, 92]. Sin embargo, los datos existentes en la literatura sobre el posible papel de p38 MAPK en esta vía de señalización no son concluyentes, mostrando una gran variabilidad según el tipo celular en el que se hayan realizado los estudios. Mientras que algunos autores señalan que IL-4 es incapaz de activar p38 MAPK en macrófagos murinos y monocitos humanos [16, 62, 67]; otros estudios señalan que p38 MAPK se activa por IL-4 en la línea celular humana de monocitos THP-1 y en la línea celular de macrófagos murinos P388D1 [65, 125]. Por otro lado, se ha descrito que p38 MAPK es capaz de activarse por IL-4 en células B, células T, células epiteliales, fibroblastos o células de carcinoma renal [62, 63, 74, 105, 157].

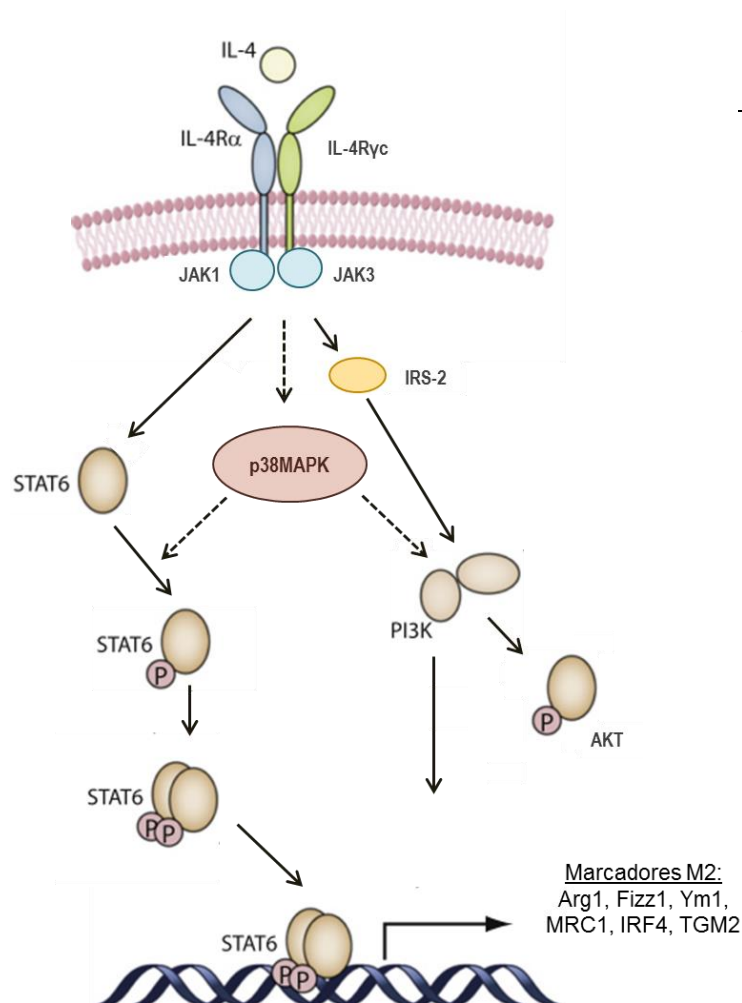
Nuestros resultados muestran que IL-4 es capaz de inducir la activación de p38 MAPK en macrófagos peritoneales así como en la línea celular de macrófagos J774. Además, inhibidores farmacológicos de p38 MAPK (SB202190 y SB203580) disminuyen de forma estadísticamente significativa la expresión de marcadores M2 en macrófagos peritoneales. Resultados que hemos corroborado mediante el silenciamiento de la expresión de p38 MAPK con siRNA específicos, así como a través de la inhibición farmacológica de p38 MAPK en un modelo de polarización M2 *in vivo* inducido mediante la administración intraperitoneal de quitina. Por el contrario, el uso de inhibidores farmacológicos de ERK y JNK no parece tener efectos significativos en los genes M2 inducidos por IL-4, lo que sugiere que estas quinasas no son esenciales en la adquisición de un fenotipo alternativo de los macrófagos. También hemos demostrado que la señalización de las JAKs acopladas al receptor es fundamental para la activación de p38 MAPK ya que el tratamiento con el inhibidor JAK-I (inhibidor de JAK-1, JAK-2 y JAK-3) es capaz de inhibir su fosforilación. Sin embargo, este efecto no se observa con el inhibidor de JAK-2 (AG490), lo que podría indicar que dicha quinasa no se requiere para la activación de p38 MAPK.

En consonancia con nuestros resultados, se ha descrito que la adenosina sola o en combinación con IL-4 aumenta la activación de p38 MAPK en macrófagos, llevando asociado un incremento en la expresión de Arg1. No obstante, estos autores no han demostrado ningún efecto en la activación de p38 MAPK mediante la estimulación de macrófagos solamente con IL-4 [16]. Otro estudio más reciente describe que la inhibición de p38 MAPK reduce los niveles de marcadores antiinflamatorios como MRC1 y Arg1 en macrófagos deficientes de calcineurina [30]. A pesar de estas aportaciones, no se ha establecido ninguna conexión directa entre IL-4, p38 MAPK y STAT6 en la polarización M2 de macrófagos. Nuestros resultados demuestran la disminución de la fosforilación de STAT6 y la disminución de la expresión de Arg1, Fizz1 e Ym1 tras el silenciamiento de p38 MAPK en macrófagos estimulados con IL-4; así como la regulación mediante p38 MAPK de otros marcadores M2 como TGM2, IRF4 o SOCS1, de los que hay pocos datos en la literatura. Así, se sabe que la inhibición de p38 MAPK disminuye la expresión de IRF3 en la línea celular de macrófagos C7 [148], y que en células T CD4<sup>+</sup> el inhibidor SB203580 es capaz de bloquear la expresión de IRF4 [1]. Sin embargo, nuestros datos son los primeros que relacionan p38 MAPK con IRF4 en macrófagos.

Junto a las vías de señalización en las que está implicada STAT6, también hemos estudiado la fosforilación de Akt como diana de PI3K, el otro mediador de la señalización de IL-4. Los resultados obtenidos corroboran que PI3K se activa en macrófagos peritoneales tras la estimulación con IL-4 dando lugar a un aumento en la expresión de marcadores M2 típicos

(Arg1, Ym1, Fizz1), tal y como se ha descrito previamente [55]. Además, nuestros datos demuestran la relevancia de PI3K en la expresión de otros genes M2 como TGM2, IRF4 y SOCS1 cuya expresión se encuentra disminuida tras el tratamiento con el inhibidor farmacológico de PI3K (LY294002). No obstante, el tratamiento con el inhibidor de PI3K solo disminuye parcialmente la inducción de la expresión de los marcadores M2, lo que indica que aunque PI3K desempeña un papel importante en la regulación de estos genes, existen otras vías de señalización implicadas en su activación. De hecho, la fosforilación de STAT6 no se ve afectada por la inhibición de PI3K, lo que confirma la independencia de ambas vías de señalización.

Por otro lado, cabe destacar que el patrón de activación temporal de Akt en respuesta a IL-4 es posterior a la activación de p38 MAPK. Este hecho, unido a los resultados que muestran que la inhibición de p38 MAPK por SB202190 bloquea por completo la fosforilación de Akt y STAT6, así como la translocación de este último al núcleo, sitúan a p38 MAPK por encima de ambas vías de señalización (Fig. d.1).



**Figura d.1. Modelo propuesto para el papel de p38 MAPK en la polarización alternativa de macrófagos.** En líneas continuas se muestran las rutas de señalización descritas hasta el momento, y en líneas discontinuas se muestra el modelo propuesto en este trabajo: IL-4 se une a su receptor provocando la activación de las JAKs y la fosforilación de p38 MAPK, el cual es capaz de activar dos rutas de señalización diferentes (STAT6 o PI3K). La activación de ambas rutas provoca que los macrófagos se polaricen hacia un fenotipo M2, caracterizado por la expresión de marcadores como Arg1, Fizz1, Ym1, MRC1, IRF4 y TGM2, entre otros.

Aunque se requieren más estudios para conocer detalladamente el mecanismo por el cual IL-4 es capaz de señalar a través de p38 MAPK, nuestros datos revelan de forma clara que IL-4 promueve la fosforilación de STAT6 y la expresión de marcadores M2 en macrófagos peritoneales de forma dependiente de la activación de p38 MAPK. De acuerdo con nuestros resultados, Bhattacharjee y colaboradores [8] han demostrado recientemente que en monocitos de sangre periférica, IL-13 induce la activación de una tirosina quinasa de la familia Src llamada Hck, la cual regula la fosforilación en tirosina de p38 MAPK a través de las quinasas MKK3/6. Además, han descrito que la activación de p38 MAPK por dicha tirosina quinasa es necesaria para la fosforilación en serina de STAT1 y STAT3, hecho que junto con la fosforilación en tirosina que sufren las STAT, desencadena la expresión de marcadores de activación alternativa en monocitos [8, 165]. Aunque estos datos no son suficientes para demostrar la implicación de las tirosinas quinasas de la familia Src en la señalización de IL-4 y en la activación de STAT6; los autores sugieren que podría tratarse de un mecanismo generalizado para las rutas de activación alternativa.

Por otra parte, otros autores proponen que las vías de p38 MAPK y Akt interaccionan a distintos niveles con independencia de PI3K [17]. De hecho se ha descrito que Akt puede formar un complejo con p38 MAPK y la MAP quinasa 2 (MK2) [170], en el que MK2 actúa activando a Akt a través de la fosforilación de la serina 473 [161]. En este sentido, y de acuerdo con nuestros resultados, se ha visto que la eliminación de p38 MAPK y/o su inhibición farmacológica suprime la fosforilación de Akt mediada por MK2 en macrófagos murinos [124] y en células de músculo liso tratadas con angiotensina II [143]. Los mecanismos propuestos por estos autores podrían explicar la relación entre p38 MAPK, Akt y STAT6, aunque sería necesario explorar si las quinasas Src o MK2 están implicadas en la regulación de la activación alternativa de macrófagos por IL-4.

Junto al papel de p38 MAPK en la activación del fenotipo alternativo de los macrófagos, otra parte importante de esta tesis se ha centrado en el estudio del gen de supresión tumoral ARF como nuevo regulador de la polarización de los macrófagos. Trabajos previos del grupo habían puesto de manifiesto la importancia de ARF en la puesta en marcha de la respuesta inflamatoria, confiriéndole un papel destacado en la activación de los macrófagos hacia el fenotipo clásico o M1. De hecho, en macrófagos obtenidos de animales deficientes en ARF, la inducción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias (como óxido nítrico, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) está drásticamente inhibida tras estimulación con diferentes ligandos inflamatorios [146]. Además, el déficit en ARF parece estar asociado con una predisposición a la activación alternativa de los macrófagos. Así, en ausencia de estímulos los macrófagos ARF $^{-/-}$  presentan una mayor

expresión de algunos marcadores M2 como Ym1 o Fizz1 [56], aunque es tras la estimulación con IL-4 o IL-13 cuando se observa un marcado incremento en los niveles de marcadores M2 (Arg1, MRC1, Ym1 y Fizz1), lo que indica que estos macrófagos presentan una polarización hacia un fenotipo alternativo [56]. A pesar de que estos datos indican claramente que ARF juega un papel esencial en los procesos de polarización de los macrófagos, los mecanismos por los cuales el déficit en este gen induce un fenotipo M2 no se conocen en profundidad. Es por ello, que en este trabajo hemos profundizado en el estudio de las diferencias y/o alteraciones existentes en las vías de señalización que se ponen en marcha tras la estimulación con IL-4 en los macrófagos WT y los macrófagos deficientes en ARF.

Nuestros resultados confirman que el tratamiento con IL-4 induce un aumento en los niveles de expresión de marcadores típicos M2 como Arg1, MRC1, Ym1 y Fizz1 en los macrófagos deficientes en ARF, superior al que se produce en los macrófagos WT, tal y como habíamos descrito previamente [56]. Además, muestran que otros marcadores M2 (IRF4, KLF4, TGM2 y MGL-2) también presentan una expresión exacerbada en ausencia de ARF, lo que corrobora el perfil alternativo de estas células. Un aspecto interesante es que este perfil alternativo que se produce en ausencia de ARF, parece ser una característica general de los macrófagos, independientemente de su origen. Así, este fenotipo M2 se observa tanto en macrófagos peritoneales y macrófagos derivados de médula ósea, poblaciones de macrófagos cuyo origen es principalmente hematopoyético; como en macrófagos alveolares que según se ha descrito recientemente, parecen tener origen embrionario [51]. Por otra parte, la ausencia de ARF no afecta a la plasticidad de los macrófagos, ya que estos siguen manteniendo su capacidad para adaptarse al entorno y responden a estímulos de tipo M1, modificando su fenotipo.

Con respecto a los mecanismos implicados en este proceso, dado que hemos demostrado el papel de p38 MAPK en la señalización de IL-4 y su implicación en la polarización alternativa de macrófagos; una mayor activación de esta quinasa podría ser una de las posibles causas por las que los macrófagos ARF<sup>-/-</sup> presentan una polarización exacerbada M2. Sin embargo, el grado de activación de p38 MAPK tras estimulación con IL-4 y el porcentaje de inhibición de la expresión de Arg1 tras el tratamiento con el inhibidor farmacológico de p38 MAPK (SB202190) es similar en macrófagos WT y ARF<sup>-/-</sup>. Estos datos indican que aunque p38 MAPK está implicada en la activación M2, no es la responsable de las diferencias observadas en ausencia de ARF. Como tampoco parece serlo la señalización a través de la ruta de PI3K, ya que la activación de Akt, sustrato de PI3K, también es similar en macrófagos WT y ARF<sup>-/-</sup> estimulados con IL-4; y la inhibición de PI3K con LY294002 muestra el mismo grado de



inhibición en la expresión de Arg1 tanto en macrófagos WT como ARF-/-.

En vista de estos resultados nos centramos en el estudio de la vía de señalización de STAT6. Lo primero que observamos fue que en los macrófagos deficientes en ARF se produce una mayor fosforilación de STAT6 cuando son estimulados con IL-4. Sin embargo, esta mayor activación no parece estar relacionada con cambios en la expresión de los receptores para IL-4. De hecho, cuando comparamos los receptores de IL-4 entre los macrófagos WT y ARF-/ observamos que no hay diferencias significativas en su expresión, como tampoco las hay en la expresión de las JAKs acopladas al receptor de tipo I (JAK1 y JAK3). Además, cuando inhibimos las JAKs tampoco se observan diferencias ni en la activación de STAT6 ni en la expresión de genes M2 (Arg1, Ym1 y Fizz1).

Diversos estudios han demostrado que STAT6, al igual que otros miembros de la familia de las STATs, está sometida a un ciclo continuo de entrada y salida del núcleo, mediado por el transportador CRM-1 [3, 20, 115]. Este ciclo además, se ha visto que es esencial para mantener la activación de STAT6 [3]. Existen numerosos estudios en los que se describe que ARF cambia la localización subcelular de algunas proteínas, y que en algunos casos interviene en el transporte entre el núcleo y el citoplasma. Así, se sabe que Mdm2 necesita exportarse del núcleo al citoplasma para promover la degradación de p53, y que ARF bloquea este transporte secuestrando a Mdm2 en el nucleolo [144]. Igual ocurre con otras proteínas como E2F1 o DP1 [24]. Nosotros pudimos comprobar que tras la estimulación con IL-4, la localización de STAT6 fosforilado en los macrófagos ARF-/ se encuentra principalmente en el núcleo, presentando mayor actividad y manteniéndose más tiempo en esa localización en comparación con los macrófagos WT. Este dato parece sugerir que el déficit en ARF está alterando el mecanismo de exporte de STAT6 del núcleo al citoplasma. De hecho, al inhibir el transportador CRM-1 con leptomicina, los niveles de STAT6 fosforilado en el núcleo de los macrófagos WT se igualan a los de los macrófagos ARF-/-. Además, este efecto no solamente ocurre con STAT6, sino que C/EBP $\beta$ , otro factor de transcripción que es capaz de cooperar con STAT6 participando en la activación de los marcadores M2, también permanece más tiempo en el núcleo en los macrófagos ARF-/-.

La sumoilación, entre otras muchas funciones, es capaz de alterar la localización subcelular de algunas proteínas, interviniendo en el transporte entre el núcleo y el citoplasma [119]. Dado que muchos estudios han situado a ARF como una proteína capaz de inducir la sumoilación [142], y STAT1 es capaz de sumoilarse en macrófagos derivados de médula ósea ante estímulos proinflamatorios como IFN $\gamma$  [6]; la hipótesis que en un principio nos parecía más

plausible era que el exporte nuclear de STAT6 podría estar regulado por este mecanismo. De hecho, Kobayashi y colaboradores proponen un modelo que podría asemejarse a lo que nosotros observamos, en el que ARF interacciona con una proteína que forma parte del proteasoma, (REGγ) promoviendo su sumoilación y su exporte nuclear posterior [76]. Sin embargo, nuestros datos no permiten concluir por el momento que STAT6 esté siendo sumoilada por ARF. Aunque el análisis de su secuencia mediante el software *GPS-SUMO* revela la existencia de un sitio susceptible de sumoilación, los estudios de co-inmunoprecipitación con STAT6 no muestran bandas de sumoilación tras ser revelados con SUMO1. Es posible que otros miembros de la familia como SUMO2 o SUMO3, puedan ser los responsables de la sumoilación de STAT6. Además, el que ARF sea una proteína poco abundante en macrófagos peritoneales y prácticamente indetectable por técnicas de Western blot, complica el estudio de sus posibles funciones; mucho más cuando se trata de procesos como la sumoilación en la que hay que forzar las condiciones de estudio para enriquecer las proteínas sumoiladas o impedir la rotura de la interacción entre SUMO y la proteína [5].

Por otra parte, como ya hemos comentado, ARF es capaz de asociarse físicamente a otras proteínas [36, 130]. De hecho, previamente en el laboratorio se describió que la interacción de ARF con el factor de transcripción E2F1 tiene un papel crucial en la inmunidad innata, concretamente en la regulación de la vía de NFκB en macrófagos [146]. Si bien los estudios de co-inmunoprecipitación no nos han permitido esclarecer el papel de ARF en la sumoilación de STAT6, si han mostrado la existencia de una interacción física entre p19ARF y STAT6. Así, en células Hek293 en las que habíamos sobreexpresado ARF, detectamos la presencia de STAT6 tras inmunoprecipitar con ARF y viceversa. Un dato interesante, es que siempre que sobreexpresamos ARF, los niveles de STAT6 disminuyen, indicando la existencia de una posible regulación negativa. De hecho, mediante estudios de microscopia confocal observamos que en ausencia de ARF, los macrófagos siempre presentan una mayor expresión de STAT6, lo que además indica que la interacción entre ARF y STAT6 no parece depender de que ARF esté sobreexpresado. Otros ejemplos de regulación negativa por parte de ARF se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se sabe que la interacción de ARF con HIF1α o Foxm1b inhibe su expresión a través de mecanismos que implican su secuestro en el nucleolo [68, 81], mientras que la inhibición de la expresión de VEGFA parece estar regulada a nivel translacional [70]. A pesar de que la interacción entre STAT6 y ARF parece clara, nuestros resultados no nos permiten dilucidar si la regulación negativa que ejerce ARF sobre STAT6 puede deberse a que la pérdida de la expresión de ARF lleva asociada un aumento en la síntesis proteica tal y como describen Apicelli y colaboradores [4]; a que ARF también es capaz de regular, no sólo la

localización subcelular de las proteínas, sino su estabilidad [107]; o bien a una menor degradación de STAT6 debido a su menor transporte desde el núcleo al citoplasma. Por último, también hay que tener en cuenta que, para que STAT6 salga del núcleo es necesaria su defosforilación. Otro posible mecanismo que no hemos explorado hasta el momento es que ARF estuviera regulando positivamente alguna fosfatasa en el núcleo que fuera la responsable de la defosforilación de STAT6. Por lo tanto, la ausencia de ARF provocaría un retraso en la defosforilación de STAT6 y con ello de su salida al citoplasma para volverse a activar. Sin embargo, hasta el momento no se conocen las fosfatasas que actúan sobre STAT6 directamente.

Aunque el mecanismo definitivo por el que ARF regula a STAT6 no lo conocemos, nuestros resultados muestran por primera vez que la ausencia de ARF provoca una mayor activación de STAT6 en respuesta a IL-4 en macrófagos. Esta activación es más sostenida en el tiempo y permite que STAT6 permanezca más tiempo activo en el núcleo, lo que puede explicar la expresión exacerbada de genes M2 en macrófagos ARF<sup>-/-</sup> tras la activación con IL-4.

Independientemente de los mecanismos por los cuales ARF es capaz de regular la polarización de los macrófagos, nuestros resultados han permitido establecer la relevancia fisiológica de este gen en la activación alternativa a través de varios modelos *in vivo*. Así por ejemplo, en el modelo de activación M2 inducido tras la administración intraperitoneal de quitina, se observa un aumento significativo en el número de macrófagos M2 así como de eosinófilos en los exudados peritoneales obtenidos de animales ARF<sup>-/-</sup> frente a los animales WT.

Por otro lado, ya hemos comentado la importancia de la existencia de un balance correcto entre una polarización M1 y M2, ya que una activación exacerbada hacia cualquiera de los dos fenotipos está relacionada con el desarrollo de diversas patologías. Es el caso de enfermedades respiratorias como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o la fibrosis pulmonar [10, 11], en las que la presencia de macrófagos M2 está adquiriendo una gran relevancia. Nuestros resultados muestran como los macrófagos alveolares de los animales ARF<sup>-/-</sup> expresan basalmente niveles mayores de marcadores M2, entre los que se incluyen Ym1, MRC1, Arg1 o Fizz1. Ym1 pertenece a la familia de las proteínas tipo quitinasas (CLPs, Chitinase-like proteins). Otros miembros de la familia son Ym2 que junto a Ym1 han sido descritos en ratón, mientras que YKL-40 y YKL-39 han sido descritos en humanos. Aumentos en los niveles de expresión de estas quitinasas se han observado en sitios de inflamación y remodelado tisular, asociándose además con diversas patologías respiratorias. Por ejemplo, en suero y en

pulmón de pacientes alérgicos y asmáticos se han detectado niveles elevados de YKL-40 [23]. También se ha visto un aumento de MRC1 en biopsias bronquiales de pacientes asmáticos, así como en macrófagos alveolares de pacientes con fibrosis idiopática [104]. Por lo tanto, el déficit en ARF parece predisponer al organismo a una activación alternativa, pudiendo ser más propenso al desarrollo de enfermedades respiratorias como asma, alergias o fibrosis. En este contexto, cabe destacar que en el modelo de inducción de polarización M2 mediante administración de quitina intraperitoneal, la expresión de Arg1 y Fizz1 es mucho mayor en los pulmones de los animales ARF-/-.

Otra observación interesante es la presencia de cristales de Ym-1 en los pulmones de los animales deficientes en ARF. Recientemente se ha descrito que esta quitinasa puede cristalizar de manera espontánea cuando se encuentra en altas concentraciones, por ejemplo en inflamaciones crónicas de tipo Th2 como asma o infecciones parasitarias, y que además de manera particular en el pulmón, estos cristales se han asociado con macrófagos M2 y patología pulmonar [99, 112, 156]. De hecho su presencia se ha descrito en otros modelos murinos como en ratones deficientes para el ligando de CD40 [52], o SHIP [113]. Por lo tanto, estos cristales podrían constituir una manifestación más de la predisposición de los animales ARF-/- a la programación alternativa de los macrófagos, facilitando en el caso concreto del pulmón el desarrollo de las patologías pulmonares previamente mencionadas.

Finalmente, uno de los procesos en los que los macrófagos M2 parecen desempeñar un papel crucial es en el desarrollo de los tumores. El microambiente tumoral está constituido por una población muy heterogénea de células estromales no malignas, que son cruciales para la progresión y la metástasis del tumor [110]. Entre ellas se encuentran los TAMs, que son el principal componente celular del estroma de muchos tumores [15, 153]. Los TAMs presentan muchas características comunes a los macrófagos M2 como por ejemplo la acción protumoral e inmunosupresora [106, 136, 147]. Mediante un modelo *in vivo* de implante subcutáneo de células tumorales B16F10, hemos demostrado que ARF, además de su función como regulador de la proliferación de las células tumorales, desempeña un papel esencial en la modulación del microambiente tumoral. Así, la ausencia de ARF promueve el reclutamiento de macrófagos en el tumor y su polarización hacia un fenotipo M2.

De hecho, los estudios histológicos de los tumores implantados en los ratones ARF-/- muestran un aumento significativo en el número de células dobles positivas para MRC1 (marcador M2) y F4/80 (marcador de macrófagos), con respecto a los tumores de los animales WT. Resultados que indican que el déficit en ARF aumenta el reclutamiento de macrófagos en el

tumor, además de su polarización hacia un fenotipo M2. Así, el análisis más detallado de los marcadores M2 en tejido completo procedente de los tumores, revela también una mayor expresión de Arg1, Fizz1 y MGL-2. Además, observamos un aumento en la expresión de citoquinas y factores de crecimiento que han sido relacionadas con la polarización alternativa, entre los que se incluyen CCL17, CCL22, CCL5 y TGF $\beta$  y que podrían ser los responsables del mayor reclutamiento de los macrófagos. De acuerdo con estos datos, la exposición de los macrófagos peritoneales ARF $^{-/-}$  a medio condicionado de células tumorales B16F10 *in vitro*, también induce una mayor expresión de marcadores M2. En este sentido se ha publicado recientemente un trabajo en el que se describe que ARF es capaz de regular la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata en un modelo agudo de leucemia de ratón tras la inactivación de Myc [166].

Numerosos datos en la bibliografía avalan la influencia de los TAMs en la regulación de la angiogénesis tumoral [96, 131, 136]. La angiogénesis desempeña un papel clave en el crecimiento del tumor. Las células tumorales requieren de un continuo flujo de oxígeno para su crecimiento y el microambiente tumoral aporta señales para el reclutamiento de células endoteliales y las condiciones óptimas para su diferenciación en endotelio maduro. Nosotros hemos observado un incremento en la densidad vascular de los tumores en los animales ARF $^{-/-}$ , tal y como lo demuestra el aumento en el número de células positivas para el marcador de endotelio CD31 (PECAM-1). Un aspecto interesante, es que en la mayoría de estos nuevos vasos se observa la presencia de lumen, lo que parece indicar la existencia de una estructura endotelial más organizada y probablemente un grado de maduración mayor. De hecho, las tinciones con el anticuerpo  $\alpha$ -SMA, que identifica células de músculo liso vascular y que también se ha relacionado con una mayor madurez en los vasos sanguíneos [167], muestran un aumento significativo del número de células que expresan este marcador en los tumores de los animales ARF $^{-/-}$ . Estas células se disponen formando una capa alrededor de las células endoteliales, dando lugar a vasos más organizados y maduros.

Además, en consonancia con el papel proangiogénico de los macrófagos M2, se observa que en la proximidad de los vasos sanguíneos de los tumores de ratones ARF $^{-/-}$  hay un mayor número de macrófagos que presentan una polarización M2, en comparación con los tumores de los ratones WT.

Los TAMs inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de la expresión de moléculas que son potentes factores proangiogénicos, entre los que se incluyen VEGF y TGF $\beta$ . Se ha descrito que ARF modula la formación de vasos en los tumores vía VEGF [70, 159].

Aunque nuestro sistema no revela cambios en la expresión de VEGF entre los tumores de los animales WT y ARF<sup>-/-</sup>, tal y como se había descrito también en células de gliomas [169]; la pérdida de ARF provoca un incremento de su receptor VEGFR2, que es fundamental para los efectos proangiogénicos de VEGF [33]. La señalización a través de VEGFR2 es inhibida por TIMP-3, que bloquea el receptor impidiendo la unión de VEGF [109]. Nuestros resultados muestran que la expresión de TIMP-3 se encuentra disminuida en los tumores de los animales ARF<sup>-/-</sup>, en consonancia con datos previos en los que se describe que en células humanas de glioma la inhibición de la angiogénesis por ARF ocurre a través de un aumento en la expresión de TIMP-3 [169]. Por otro lado, niveles altos de expresión de TIMP-3 en células endoteliales se han relacionado con una menor expresión de VE-cadherina, una molécula de adhesión fundamental en la migración, la formación de los vasos y el mantenimiento de la integridad vascular [137]. Este hecho explicaría que la expresión de VE-cadherina esté significativamente aumentada en los tumores de los animales ARF<sup>-/-</sup>. La mayor expresión de VE-cadherina junto con la de TGFβ, posiblemente está contribuyendo al desarrollo de nuevos vasos, ya que ambas moléculas se han relacionado con procesos fundamentales de la angiogénesis como son la migración de las células endoteliales, la formación de nuevos vasos y el mantenimiento de la integridad vascular [13, 48, 137].

Con respecto a las posibles interacciones de TIMP-3 con las metaloproteinasas, aunque se ha descrito que otras TIMPs (TIMP-1 y TIMP-2) ejercen sus efectos inhibitorios al bloquear la actividad MMP, los efectos inhibitorios de TIMP-3 en angiogénesis se sabe que también pueden ser independientes de dicha actividad [109, 137, 169]. De hecho, no hemos detectado cambios significativos en los sustratos de TIMP-1 ni TIMP-3 (MMP-2 y MMP-9 respectivamente), lo que sugiere que TIMP-3 podría estar ejerciendo su acción a través de VEGFR2 y VE-Cadherina probablemente de forma independiente de metaloproteinasas.

Por otro lado, la expresión de moléculas de adhesión endoteliales como VCAM-1 se encuentra notablemente elevada en los tumores de los animales ARF<sup>-/-</sup>, lo que podría contribuir al reclutamiento de macrófagos [22]. Estas observaciones sugieren que los macrófagos M2 que se acumulan alrededor de los vasos en los tumores de animales deficientes en ARF, contribuyen a promover la vascularización del tumor, seguramente mediante la modulación de distintas moléculas del eje TIMP-3/VEGFR2 o a través del aumento en la expresión de VE-cadherina y TGFβ. Esta activación de la angiogénesis parece ser crítica en la aceleración del crecimiento tumoral, ya que no hemos visto alteraciones en la proliferación celular como se había descrito en otros trabajos [149].


En este trabajo también hemos mostrado una mayor expresión de Ym1 en los tumores de los animales ARF-/- . Al papel ya establecido de Ym1 como marcador de la polarización M2 de macrófagos, hay que sumar el que se ha descrito recientemente para YKL-40 como promotor de la angiogénesis tumoral no sólo como factor angiogénico independiente, sino también cooperando con VEGF [31, 34, 126]. Aunque nuestros datos no nos permiten afirmar que Ym1 desempeñe además un papel en la regulación de la angiogénesis, es tentador especular que los altos niveles de Ym1 también podrían contribuir a promover la angiogénesis en ratones ARF-/- .

En resumen, nuestros resultados proporcionan nuevas evidencias para entender los mecanismos de señalización de IL-4, lo que podría facilitar el desarrollo de agentes terapéuticos más efectivos contra aquellas enfermedades en las que esta ruta de señalización se encuentra implicada. Se ha descrito que IL-4 y STAT6 son un componente clave en el desarrollo de patologías respiratorias como el asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar, las cuales están relacionadas con una presencia de macrófagos M2 exacerbada [10]. Además, nuevos datos en la bibliografía confirman una mayor activación de p38 MAPK en pacientes asmáticos severos y con EPOC, lo que sugiere que p38 MAPK podría ser una diana potencial para el tratamiento de estas patologías, que además llevan asociadas un exceso de macrófagos con activación alternativa.

Por último, nuestro estudio proporciona resultados sólidos sobre el papel del gen supresor tumoral ARF en la regulación de la polarización de los macrófagos, poniendo de manifiesto la relevancia fisiológica de este gen en patologías que presentan un claro desequilibrio en el balance M1/M2. Así ARF desempeña un papel crítico en el crecimiento tumoral y la angiogénesis a través de la modulación del fenotipo de los macrófagos asociados al tumor, así como en el mantenimiento de la homeostasis del pulmón. Esos resultados podrían tener una implicación importante en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en la reeducación de los macrófagos, que podrían mejorar las terapias actuales.







# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. La estimulación de macrófagos peritoneales con IL-4 induce la activación de p38 MAPK de forma dependiente del tiempo.
2. La inhibición de p38 MAPK bloquea la fosforilación de STAT6 y de Akt. Este hecho indica que la activación de p38 MAPK es necesaria para las dos rutas de señalización del receptor de IL-4: STAT6 y PI3k.
3. La inactivación de p38 MAPK suprime la expresión de marcadores M2 tras la estimulación con IL-4, indicando que esta quinasa es fundamental en la polarización alternativa desencadenada por la señalización de IL-4.
4. Los macrófagos peritoneales deficientes en ARF muestran un fenotipo M2 exacerbado tras la estimulación con IL-4, en paralelo con una mayor activación y localización nuclear de STAT6.
5. El déficit en ARF tiene consecuencias *in vivo* relacionadas con una activación M2 exacerbada de los macrófagos. Así, los ratones deficientes en ARF exhiben un fenotipo M2 exacerbado en un modelo de polarización M2 *in vivo* inducido mediante la administración de quitina; y los macrófagos alveolares deficientes en ARF presentan una mayor polarización M2.
6. ARF es fundamental para la regulación del microambiente tumoral. Su ausencia provoca una mayor progresión del tumor debido a una mayor infiltración de TAMs con un fenotipo M2 y una mayor angiogénesis.





# BIBLIOGRAFÍA





# BIBLIOGRAFÍA

1. Alam, M.S., M.M. Gaida, Y. Ogawa, A.G.A. Kolios, F. Lasitschka, and J.D. Ashwell (2014). Counter-regulation of T cell effector function by differentially activated p38. *The Journal of experimental medicine* **211**: 1257-1270.
2. Allavena, P. and a. Mantovani (2012). Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clinical and experimental immunology* **167**: 195-205.
3. Andrews, R.P., M.B. Ericksen, C.M. Cunningham, M.O. Daines, and G.K.K. Hershey (2002). Analysis of the life cycle of stat6. Continuous cycling of STAT6 is required for IL-4 signaling. *The Journal of biological chemistry* **277**: 36563-36569.
4. Apicelli, A.J., L.B. Maggi, Jr., A.C. Hirbe, A.P. Miceli, M.E. Olanich, C.L. Schulte-Winkeler, A.J. Saporita, M. Kuchenreuther, J. Sanchez, K. Weilbaecher, and J.D. Weber (2008). A non-tumor suppressor role for basal p19ARF in maintaining nucleolar structure and function. *Mol Cell Biol* **28**: 1068-1080.
5. Becker, J., S.V. Barysch, S. Karaca, C. Dittner, H.-H. Hsiao, M.B. Diaz, S. Herzig, H. Urlaub, and F. Melchior (2013). Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**: 525-531.
6. Begitt, A., M. Driescher, K.P. Knobloch, and U. Vinkemeier (2011). SUMO conjugation of STAT1 protects cells from hyperresponsiveness to IFNgamma. *Blood* **118**: 1002-1007.
7. Bertwistle, D., M. Sugimoto, and C.J. Sherr (2004). Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Molecular and cellular biology* **24**: 985-986.
8. Bhattacharjee, A., S. Pal, G.M. Feldman, and M.K. Cathcart (2011). Hck is a key regulator of gene expression in alternatively activated human monocytes. *The Journal of biological chemistry* **286**: 36709-36723.
9. Biswas, S.K., L. Gangi, S. Paul, T. Schioppa, A. Sacconi, M. Sironi, B. Bottazzi, A. Doni, B. Vincenzo, F. Pasqualini, L. Vago, M. Nebuloni, A. Mantovani, and A. Sica (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* **107**: 2112-2122.

10. Boorsma, C.E., C. Draijer, and B.N. Melgert (2013). Macrophage heterogeneity in respiratory diseases. *Mediators of inflammation* **2013**: 769214.
11. Byers, D.E. and M.J. Holtzman (2011). Alternatively activated macrophages and airway disease. *Chest* **140**: 768-774.
12. Byles, V., A.J. Covarrubias, I. Ben-Sahra, D.W. Lamming, D.M. Sabatini, B.D. Manning, and T. Horng (2013). The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nature communications* **4**: 2834.
13. Corada, M., M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M.G. Lampugnani, I. Martin-Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D.M. McDonald, P.A. Ward, and E. Dejana (1999). Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 9815-9820.
14. Corraliza, I.M., M.L. Campo, G. Soler, and M. Modolell (1994). Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods* **174**: 231-235.
15. Coussens, L.M. and Z. Werb (2002). Inflammation and cancer. *Nature* **420**: 860-867.
16. Csóka, B., Z. Selmeczy, B. Koscsó, Z.H. Németh, P. Pacher, P.J. Murray, D. Kepka-Lenhart, S.M. Morris, W.C. Gause, S.J. Leibovich, and G. Haskó (2012). Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**: 376-386.
17. Cuadrado, A. and A.R. Nebreda (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical journal* **429**: 403-417.
18. Chang, C.-I., B. Zoghi, J.C. Liao, and L. Kuo (2000). The Involvement of Tyrosine Kinases, Cyclic AMP/Protein Kinase A, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in IL-13-Mediated Arginase I Induction in Macrophages: Its Implications in IL-13-Inhibited Nitric Oxide Production. *The Journal of Immunology* **165**: 2134-2141.
19. Chang, N.C., S.I. Hung, K.Y. Hwa, I. Kato, J.E. Chen, C.H. Liu, and A.C. Chang (2001). A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. *The Journal of biological chemistry* **276**: 17497-506.
20. Chen, H.-C. and N.C. Reich (2010). Live cell imaging reveals continuous STAT6 nuclear trafficking. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **185**: 64-70.
21. Chen, L. and J. Chen (2003). MDM2-ARF complex regulates p53 sumoylation. *Oncogene* **22**: 5348-5357.



22. Chen, Q. and J. Massagué (2012). Molecular pathways: VCAM-1 as a potential therapeutic target in metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**: 5520-5525.
23. Chupp, G.L., C.G. Lee, N. Jarjour, Y.M. Shim, C.T. Holm, S. He, J.D. Dziura, J. Reed, A.J. Coyle, P. Kiener, M. Cullen, M. Grandsaigne, M.C. Dombret, M. Aubier, M. Pretolani, and J.A. Elias (2007). A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med* **357**: 2016-2027.
24. Datta, A., A. Nag, and P. Raychaudhuri (2002). the E2F1 / DP1 Complex by ARF Differential Regulation of E2F1 , DP1 , and the E2F1 / DP1 Complex by ARF. *Mol Cell Biol* **22**: 8398-8408.
25. Dickensheets, H., N. Vazquez, F. Sheikh, S. Gingras, P.J. Murray, J.J. Ryan, and R.P. Donnelly (2007). Suppressor of cytokine signaling-1 is an IL-4-inducible gene in macrophages and feedback inhibits IL-4 signaling. *Genes and immunity* **8**: 21-27.
26. Doherty, T.A., N. Khorram, K. Sugimoto, D. Sheppard, P. Rosenthal, J.Y. Cho, A. Pham, M. Miller, M. Croft, and D.H. Broide (2012). Alternaria induces STAT6-dependent acute airway eosinophilia and epithelial FIZZ1 expression that promotes airway fibrosis and epithelial thickness. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **188**: 2622-2629.
27. Doyle, A.G., G. Herbein, L.J. Montaner, A.J. Minty, D. Caput, P. Ferrara, and S. Gordon (1994). Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur J Immunol* **24**: 1441-1445.
28. Draijer, C., P. Robbe, C.E. Boorsma, M.N. Hylkema, and B.N. Melgert (2013). Characterization of macrophage phenotypes in three murine models of house-dust-mite-induced asthma. *Mediators of inflammation* **2013**: 632049.
29. Du, X., K. Stocklauser-Farber, and P. Rosen (1999). Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic Biol Med* **27**: 752-763.
30. Escolano, A., S. Martínez-Martínez, A. Alfranca, K. Urso, H.M. Izquierdo, M. Delgado, F. Martín, G. Sabio, D. Sancho, P. Gómez-del Arco, and J.M. Redondo (2014). Specific calcineurin targeting in macrophages confers resistance to inflammation via MKP-1 and p38. *The EMBO journal* **33**: 1117-1133.
31. Faibish, M., R. Francescone, B. Bentley, W. Yan, and R. Shao (2011). A YKL-40-neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers. *Molecular cancer therapeutics* **10**: 742-751.

32. Filion, L.G., G. Graziani-Bowering, D. Matusevicius, and M.S. Freedman (2003). Monocyte-derived cytokines in multiple sclerosis. *Clinical and experimental immunology* **131**: 324-334.
33. Fontanella, C., E. Ongaro, S. Bolzonello, M. Guardascione, G. Fasola, and G. Aprile (2014). Clinical advances in the development of novel VEGFR2 inhibitors. *Annals of translational medicine* **2**: 123.
34. Francescone, R.A., S. Scully, M. Faibish, S.L. Taylor, D. Oh, L. Moral, W. Yan, B. Bentley, and R. Shao (2011). Role of YKL-40 in the angiogenesis, radioresistance, and progression of glioblastoma. *J Biol Chem* **286**: 15332-15343.
35. Fritz, J.M., M.A. Tennis, D.J. Orlicky, H. Lin, C. Ju, E.F. Redente, K.S. Choo, T.A. Staab, R.J. Bouchard, D.T. Merrick, A.M. Malkinson, and L.D. Dwyer-Nield (2014). Depletion of tumor-associated macrophages slows the growth of chemically induced mouse lung adenocarcinomas. *Frontiers in immunology* **5**: 587.
36. Gallagher, S.J., R.F. Kefford, and H. Rizos (2006). The ARF tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* **38**: 1637-1641.
37. García, M.A., M. Collado, C. Muñoz-Fontela, A. Matheu, L. Marcos-Villar, J. Arroyo, M. Esteban, M. Serrano, and C. Rivas (2006). Antiviral action of the tumor suppressor ARF. *The EMBO journal* **25**: 4284-4292.
38. Geiss-Friedlander, R. and F. Melchior (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 947-956.
39. Ghassabeh, G.H., P. De Baetselier, L. Brys, W. Noël, J.A. Van Ginderachter, S. Meerschaut, A. Beschin, F. Brombacher, and G. Raes (2006). Identification of a common gene signature for type II cytokine-associated myeloid cells elicited in vivo in different pathologic conditions. *Blood* **108**: 575-583.
40. Gibbons, M.A., A.C. MacKinnon, P. Ramachandran, K. Dhaliwal, R. Duffin, A.T. Phythian-Adams, N. van Rooijen, C. Haslett, S.E. Howie, A.J. Simpson, N. Hirani, J. Gauldie, J.P. Iredale, T. Sethi, and S.J. Forbes (2011). Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **184**: 569-581.
41. Gibson, S.L., C.Y. Dai, H.-W. Lee, R.A. DePinho, M.S. Gee, W.M.F. Lee, E.E. Furth, C. Brensinger, and G.H. Enders (2003). Inhibition of colon tumor progression and angiogenesis by the Ink4a/Arf locus. *Cancer research* **63**: 742-746.
42. Ginhoux, F., J.L. Schultze, P.J. Murray, J. Ochando, and S.K. Biswas (2015). New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nature immunology* **17**: 34-40.

43. Gomez Perdiguero, E., K. Klapproth, C. Schulz, K. Busch, E. Azzoni, L. Crozet, H. Garner, C. Trouillet, M.F. de Bruijn, F. Geissmann, and H.-R. Rodewald (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **518**: 547-551.
44. González-Navarro, H., Y.N. Abu Nabah, A. Vinué, M.J. Andrés-Manzano, M. Collado, M. Serrano, and V. Andrés (2010). p19(ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* **55**: 2258-2268.
45. Gordon, R.A., G. Grigoriev, A. Lee, G.D. Kalliolias, and L.B. Ivashkiv (2012). The interferon signature and STAT1 expression in rheumatoid arthritis synovial fluid macrophages are induced by tumor necrosis factor  $\alpha$  and counter-regulated by the synovial fluid microenvironment. *Arthritis and rheumatism* **64**: 3119-3128.
46. Gordon, S. and F.O. Martinez (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* **32**: 593-604.
47. Gordon, S., A. Plüddemann, and F. Martinez Estrada (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunological Reviews* **262**: 36-55.
48. Goumans, M.-J., G. Valdimarsdottir, S. Itoh, A. Rosendahl, P. Sideras, and P. ten Dijke (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *The EMBO journal* **21**: 1743-1753.
49. Gray, M.J., M. Poljakovic, D. Kepka-Lenhart, and S.M. Morris (2005). Induction of arginase I transcription by IL-4 requires a composite DNA response element for STAT6 and C/EBP $\beta$ . *Gene* **353**: 98-106.
50. Green, L.C., D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, and S.R. Tannenbaum (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126**: 131-138.
51. Guillems, M., I. De Kleer, S. Henri, S. Post, L. Vanhoutte, S. De Prijck, K. Deswarte, B. Malissen, H. Hammad, and B.N. Lambrecht (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *The Journal of experimental medicine* **210**: 1977-1992.
52. Guo, L., R.S. Johnson, and J.C. Schuh (2000). Biochemical characterization of endogenously formed eosinophilic crystals in the lungs of mice. *J Biol Chem* **275**: 8032-8037.
53. Gupta, S., M. Jiang, A. Anthony, and A.B. Pernis (1999). Lineage-specific modulation of interleukin 4 signaling by interferon regulatory factor 4. *The Journal of experimental medicine* **190**: 1837-1848.

54. Hale, K.K., D. Trollinger, M. Rihaneck, and C.L. Manthey (1999). Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol* **162**: 4246-4252.
55. Heller, N.M., X. Qi, I.S. Junttila, K.A. Shirey, S.N. Vogel, W.E. Paul, and A.D. Keegan (2009). Type I IL-4Rs selectively activate IRS-2 to induce target gene expression in macrophages. *Sci Signal* **1**: 1-29.
56. Herranz, S., P.G. Través, A. Luque, and S. Hortelano (2012). Role of the tumor suppressor ARF in macrophage polarization: Enhancement of the M2 phenotype in ARF-deficient mice. *Oncoimmunology* **1**: 1227-1238.
57. Hirst, S.J., M.P. Hallsworth, Q. Peng, and T.H. Lee (2002). Selective induction of eotaxin release by interleukin-13 or interleukin-4 in human airway smooth muscle cells is synergistic with interleukin-1beta and is mediated by the interleukin-4 receptor alpha-chain. *American journal of respiratory and critical care medicine* **165**: 1161-1171.
58. Hoeffel, G., J. Chen, Y. Lavin, D. Low, F.F. Almeida, P. See, A.E. Beaudin, J. Lum, I. Low, E.C. Forsberg, M. Poidinger, F. Zolezzi, A. Larbi, L.G. Ng, J.K.Y. Chan, M. Greter, B. Becher, I.M. Samokhvalov, M. Merad, and F. Ginhoux (2015). C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* **42**: 665-678.
59. Hoeffel, G. and F. Ginhoux (2015). Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Frontiers in immunology* **6**: 486.
60. Hosoe, S., T. Ogura, S. Hayashi, K. Komuta, T. Ikeda, T. Shirasaka, I. Kawase, T. Masuno, and S. Kishimoto (1989). Induction of tumoricidal macrophages from bone marrow cells of normal mice or mice bearing a colony-stimulating-factor-producing tumor. *Cancer Immunol Immunother* **28**: 116-122.
61. Hung, S.-I., A.C. Chang, I. Kato, and N.-C.A. Chang (2002). Transient expression of Ym1, a heparin-binding lectin, during developmental hematopoiesis and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **72**: 72-82.
62. Hunt, A.E., L.M. Williams, F.V. Lali, and B.M.J. Foxwell (2002). IL-4 regulation of p38 MAPK signaling is dependent on cell type. *Cytokine* **18**: 295-303.
63. Ihn, H., K. Yamane, Y. Asano, M. Kubo, and K. Tamaki (2002). IL-4 Up-Regulates the Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 in Dermal Fibroblasts Via the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Pathway. *The Journal of Immunology* **168**: 1895-1902.

64. Imamura, K., A. Suzumura, F. Hayashi, and T. Marunouchi (1993). Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* **87**: 281-285.
65. Jang, Y.-S., H.-A. Kim, S.-R. Park, M.-R. Lee, J.-B. Park, and P.-H. Kim (2009). IL-4 stimulates mouse macrophages to express APRIL through p38MAPK and two different downstream molecules, CREB and Stat6. *Cytokine* **47**: 43-47.
66. Jiménez-García, L., S. Herránz, A. Luque, and S. Hortelano (2015). Critical role of p38 MAPK in IL-4-induced alternative activation of peritoneal macrophages. *European Journal of Immunology* **45**: 273-286.
67. Jin, C., L. Wu, J. Li, M. Fang, L. Cheng, and N. Wu (2012). Multiple signaling pathways are involved in the interleukine-4 regulated expression of DC-SIGN in THP-1 cell line. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2012**: 357060.
68. Kalinichenko, V.V., M.L. Major, X. Wang, V. Petrovic, J. Kuechle, H.M. Yoder, M.B. Dennewitz, B. Shin, A. Datta, P. Raychaudhuri, and R.H. Costa (2004). Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes & Development* **18**: 830-850.
69. Kamijo, T., F. Zindy, M.F. Roussel, D.E. Quelle, J.R. Downing, R.a. Ashmun, G. Grosveld, and C.J. Sherr (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91**: 649-659.
70. Kawagishi, H., H. Nakamura, M. Maruyama, S. Mizutani, K. Sugimoto, M. Takagi, and M. Sugimoto (2010). ARF suppresses tumor angiogenesis through translational control of VEGFA mRNA. *Cancer Research* **70**: 4749-4758.
71. Kawanishi, N., H. Yano, Y. Yokogawa, and K. Suzuki (2010). Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev* **16**: 105-118.
72. Kelly-Welch, A.E., E.M. Hanson, M.R. Boothby, and A.D. Keegan (2003). Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science (New York, N.Y.)* **300**: 1527-1528.
73. Kim, E.Y., J.T. Battaile, A.C. Patel, Y. You, E. Agapov, M.H. Grayson, L.A. Benoit, D.E. Byers, Y. Alevy, J. Tucker, S. Swanson, R. Tidwell, J.W. Tyner, J.D. Morton, M. Castro, D. Polineni, G.A. Patterson, R.A. Schwendener, J.D. Allard, G. Peltz, and M.J. Holtzman (2008). Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nature medicine* **14**: 633-640.

74. Kim, H.D., S.-J. Yu, H.S. Kim, Y.-J. Kim, J.M. Choe, Y.G. Park, J. Kim, and J. Sohn (2013). Interleukin-4 induces senescence in human renal carcinoma cell lines through STAT6 and p38 MAPK. *The Journal of biological chemistry* **288**: 28743-28754.
75. Kim, J.Y., E.H. Song, S. Lee, J.H. Lim, J.S. Choi, I.U. Koh, J. Song, and W.H. Kim (2010). The induction of STAT1 gene by activating transcription factor 3 contributes to pancreatic beta-cell apoptosis and its dysfunction in streptozotocin-treated mice. *Cell Signal* **22**: 1669-1680.
76. Kobayashi, T., J. Wang, H. Al-Ahmadie, and C. Abate-Shen (2013). ARF regulates the stability of p16 protein via REGγ-dependent proteasome degradation. *Molecular cancer research : MCR* **11**: 828-833.
77. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
78. Lavin, Y., A. Mortha, A. Rahman, and M. Merad (2015). Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* **15**: 731-744.
79. Liu, T., H. Jin, M. Ullenbruch, B. Hu, N. Hashimoto, B. Moore, A. McKenzie, N.W. Lukacs, and S.H. Phan (2004). Regulation of found in inflammatory zone 1 expression in bleomycin-induced lung fibrosis: role of IL-4/IL-13 and mediation via STAT-6. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **173**: 3425-3431.
80. Liu, T., H. Yu, M. Ullenbruch, H. Jin, T. Ito, Z. Wu, J. Liu, and S.H. Phan (2014). The in vivo fibrotic role of FIZZ1 in pulmonary fibrosis. *PloS one* **9**: e88362.
81. Liu, W., S.-M. Shen, X.-Y. Zhao, and G.-Q. Chen (2012). Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *International journal of biochemistry and molecular biology* **3**: 165-178.
82. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation* **117**: 175-184.
83. Luzina, I.G., A.D. Keegan, N.M. Heller, G.a.W. Rook, T. Shea-Donohue, and S.P. Atamas (2012). Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *Journal of leukocyte biology* **92**: 753-764.
84. Mantovani, A., S.K. Biswas, M.R. Galdiero, A. Sica, and M. Locati (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology* **229**: 176-185.
85. Martinez, F.O. and S. Gordon (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports* **6**: 1-13.

86. Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology* **27**: 451-483.
87. Martinez, F.O., L. Helming, R. Milde, A. Varin, B.N. Melgert, C. Draijer, B. Thomas, M. Fabbri, A. Crawshaw, L.P. Ho, N.H.T. Hacken, V.C. Jime, N.A. Kootstra, D.R. Greaves, M. Locati, A. Mantovani, and S. Gordon (2013). Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages : similarities and differences. **121**: 57-69.
88. Martinez, F.O., A. Sica, A. Mantovani, and M. Locati (2008). Macrophage activation and polarization. *BioScience* **13**: 453-461.
89. McWhorter, F.Y., T. Wang, P. Nguyen, T. Chung, and W.F. Liu (2013). Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 17253-17258.
90. Melgert, B.N., N.H. ten Hacken, B. Rutgers, W. Timens, D.S. Postma, and M.N. Hylkema (2011). More alternative activation of macrophages in lungs of asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* **127**: 831-833.
91. Mills, C.D., K. Kincaid, J.M. Alt, M.J. Heilman, and A.M. Hill (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology* **164**: 6166-6173.
92. Moore, P.E., T.L. Church, D.D. Chism, R.A. Panettieri, and S.A. Shore (2002). IL-13 and IL-4 cause eotaxin release in human airway smooth muscle cells: a role for ERK. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **282**: L847-53.
93. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* **7**: 145-173.
94. Mosser, D.M. and J.P. Edwards (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology* **8**: 958-969.
95. Mulherin, D., O. Fitzgerald, and B. Bresnihan (1996). Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **39**: 115-124.
96. Murdoch, C., M. Muthana, S.B. Coffelt, and C.E. Lewis (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* **8**: 618-631.
97. Murray, Peter J., Judith E. Allen, Subhra K. Biswas, Edward A. Fisher, Derek W. Gilroy, S. Goerdt, S. Gordon, John A. Hamilton, Lionel B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, Fernando O. Martinez, J.-L. Mege, David M. Mosser, G. Natoli, Jeroen P. Saeij, Joachim L. Schultze, Kari A. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, Jo A. van Ginderachter, Stefanie N. Vogel, and Thomas A. Wynn (2014). Macrophage

Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **41**: 14-20.

98. Murray, P.J. and T.A. Wynn (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews. Immunology* **11**: 723-737.
99. Nair, M.G., D.W. Cochrane, and J.E. Allen (2003). Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro. *Immunol Lett* **85**: 173-180.
100. Nair, M.G., I.J. Gallagher, M.D. Taylor, P.n. Loke, P.S. Coulson, R.A. Wilson, R.M. Maizels, and J.E. Allen (2005). Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. *Infection and immunity* **73**: 385-394.
101. Nelms, K., A.D. Keegan, J. Zamorano, J.J. Ryan, and W.E. Paul (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual review of immunology* **17**: 701-738.
102. Okuno, Y., A. Nakamura-Ishizu, K. Kishi, T. Suda, and Y. Kubota (2011). Bone marrow-derived cells serve as proangiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing. *Blood* **117**: 5264-5272.
103. Pauleau, A.-L., R. Rutschman, R. Lang, A. Pernis, S.S. Watowich, and P.J. Murray (2004). Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**: 7565-7573.
104. Pechkovsky, D.V., A. Prasse, F. Kollert, K.M. Engel, J. Dentler, W. Luttmann, K. Friedrich, J. Muller-Quernheim, and G. Zissel (2010). Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. *Clin Immunol* **137**: 89-101.
105. Pesu, M., S. Aittomäki, K. Takaluoma, A. Lagerstedt, and O. Silvennoinen (2002). p38 Mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-4-induced gene expression by stimulating STAT6-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry* **277**: 38254-3861.
106. Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews. Cancer* **4**: 71-78.
107. Pollice, A., M. Vivo, and G.L. Mantia (2008). The promiscuity of ARF interactions with the proteasome. *FEBS Letters* **582**: 3257-3262.
108. Pyonteck, S.M., L. Akkari, A.J. Schuhmacher, R.L. Bowman, L. Sevenich, D.F. Quail, O.C. Olson, M.L. Quick, J.T. Huse, V. Teijeiro, M. Setty, C.S. Leslie, Y. Oei, A. Pedraza, J. Zhang, C.W. Brennan, J.C. Sutton, E.C. Holland, D. Daniel, and J.a. Joyce (2013). CSF-1R



- inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nature medicine* **19**: 1264-1272.
109. Qi, J.H., Q. Ebrahim, N. Moore, G. Murphy, L. Claesson-Welsh, M. Bond, A. Baker, and B. Anand-Apte (2003). A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nature medicine* **9**: 407-415.
  110. Quail, D.F. and J.a. Joyce (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine* **19**: 1423-1437.
  111. Quelle, D.E., F. Zindy, R.a. Ashmun, and C.J. Sherr (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**: 993-1000.
  112. Raes, G., P. De Baetselier, W. Noël, A. Beschin, F. Brombacher, and G. Hassanzadeh Gh (2002). Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *Journal of leukocyte biology* **71**: 597-602.
  113. Rauh, M.J., V. Ho, C. Pereira, A. Sham, L.M. Sly, V. Lam, L. Huxham, A.I. Minchinton, A. Mui, and G. Krystal (2005). SHIP represses the generation of alternatively activated macrophages. *Immunity* **23**: 361-374.
  114. Reese, T.a., H.-E. Liang, A.M. Tager, A.D. Luster, N. Van Rooijen, D. Voehringer, and R.M. Locksley (2007). Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* **447**: 92-96.
  115. Reich, N.C. (2013). STATs get their move on. *Jak-Stat* **2**: e27080.
  116. Reich, N.C. and L. Liu (2006). Tracking STAT nuclear traffic. *Nature reviews. Immunology* **6**: 602-612.
  117. Ries, S.J., C.H. Brandts, A.S. Chung, C.H. Biederer, B.C. Hann, E.M. Lipner, F. McCormick, and W.M. Korn (2000). Loss of p14ARF in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015). *Nature medicine* **6**: 1128-1133.
  118. Rizos, H., S. Woodruff, and R.F. Kefford (2005). p14ARF interacts with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and promotes the sumoylation of its binding partners. *Cell Cycle* **4**: 597-603.
  119. Rodríguez, J.a. (2014). Interplay between nuclear transport and ubiquitin/SUMO modifications in the regulation of cancer-related proteins. *Seminars in cancer biology* **1**: 1-9.
  120. Rogers, R.S., C.M. Horvath, and M.J. Matunis (2003). SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *The Journal of biological chemistry* **278**: 30091-30097.

121. Sandoval, R., J. Xue, M. Pilkinton, D. Salvi, H. Kiyokawa, and O.R. Colamonici (2004). Different requirements for the cytostatic and apoptotic effects of type I interferons. Induction of apoptosis requires ARF but not p53 in osteosarcoma cell lines. *J Biol Chem* **279**: 32275-32280.
122. Santiago, A., D. Li, L.Y. Zhao, A. Godsey, and D. Liao (2013). p53 SUMOylation promotes its nuclear export by facilitating its release from the nuclear export receptor CRM1. *Molecular biology of the cell* **24**: 2739-2752.
123. Satoh, T., O. Takeuchi, A. Vandenbon, K. Yasuda, Y. Tanaka, Y. Kumagai, T. Miyake, K. Matsushita, T. Okazaki, T. Saitoh, K. Honma, T. Matsuyama, K. Yui, T. Tsujimura, D.M. Standley, K. Nakanishi, K. Nakai, and S. Akira (2010). The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nature immunology* **11**: 936-944.
124. Seimon, T.A., Y. Wang, S. Han, T. Senokuchi, D.M. Schrijvers, G. Kuriakose, A.R. Tall, and I.A. Tabas (2009). Macrophage deficiency of p38alpha MAPK promotes apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**: 886-898.
125. Shao, Q., H. Ning, J. Lv, Y. Liu, X. Zhao, G. Ren, A. Feng, Q. Xie, J. Sun, B. Song, Y. Yang, W. Gao, K. Ding, M. Yang, M. Hou, J. Peng, and X. Qu (2012). Regulation of Th1/Th2 polarization by tissue inhibitor of metalloproteinase-3 via modulating dendritic cells. *Blood* **119**: 4636-4644.
126. Shao, R., K. Hamel, L. Petersen, Q.J. Cao, R.B. Arenas, C. Bigelow, B. Bentley, and W. Yan (2009). YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene* **28**: 4456-4468.
127. Sharpless, N.E. (2005). INK4a/ARF: A multifunctional tumor suppressor locus. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **576**: 22-38.
128. Sheldon, K.E., H. Shandilya, D. Kepka-Lenhart, M. Poljakovic, A. Ghosh, and S.M. Morris (2013). Shaping the murine macrophage phenotype: IL-4 and cyclic AMP synergistically activate the arginase I promoter. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **191**: 2290-2298.
129. Sherr, C.J. (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**: 731-737.
130. Sherr, C.J. (2006). Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nature reviews. Cancer* **6**: 663-673.
131. Sica, A., P. Allavena, and A. Mantovani (2008). Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer letters* **267**: 204-215.

132. Sica, A., P. Larghi, A. Mancino, L. Rubino, C. Porta, M.G. Totaro, M. Rimoldi, S.K. Biswas, P. Allavena, and A. Mantovani (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in Cancer Biology* **18**: 349-355.
133. Sica, A. and A. Mantovani (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation* **122**: 787-95.
134. Singh, R.J.R., J.C. Mason, E.A. Lidington, D.R. Edwards, R.K. Nuttall, R. Khokha, V. Knauper, G. Murphy, and J. Gavrilovic (2005). Cytokine stimulated vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ectodomain release is regulated by TIMP-3. *Cardiovascular research* **67**: 39-49.
135. Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
136. Solinas, G., G. Germano, A. Mantovani, and P. Allavena (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of leukocyte biology* **86**: 1065-1073.
137. Spurbeck, W.W., C.Y. Ng, T.S. Strom, E.F. Vanin, and A.M. Davidoff (2002). Enforced expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 affects functional capillary morphogenesis and inhibits tumor growth in a murine tumor model. *Blood* **100**: 3361-3368.
138. Stein, M., S. Keshav, N. Harris, and S. Gordon (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine* **176**: 287-292.
139. Stütz, A.M., L.A. Pickart, A. Trifilieff, T. Baumruker, E. Prieschl-Strassmayr, and M. Woisetschläger (2003). The Th2 cell cytokines IL-4 and IL-13 regulate found in inflammatory zone 1/resistin-like molecule alpha gene expression by a STAT6 and CCAAT/enhancer-binding protein-dependent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **170**: 1789-1796.
140. Sun, L., M.C. Louie, K.M. Vannella, C.A. Wilke, A.M. LeVine, B.B. Moore, and T.P. Shanley (2011). New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **300**: L341-53.
141. Szanto, A., B.L. Balint, Z.S. Nagy, E. Barta, B. Dezso, A. Pap, L. Szeles, S. Poliska, M. Oros, R.M. Evans, Y. Barak, J. Schwabe, and L. Nagy (2010). STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR $\gamma$ -regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity* **33**: 699-712.

142. Tago, K., S. Chiocca, and C.J. Sherr (2005). Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: a p53-independent function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 7689-7694.
143. Taniyama, Y., M. Ushio-Fukai, H. Hitomi, P. Rocic, M.J. Kingsley, C. Pfahnl, D.S. Weber, R.W. Alexander, and K.K. Griendling (2004). Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Cell physiology* **287**: C494-9.
144. Tao, W. and A.J. Levine (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6937-6941.
145. Tauber, A.I. (2003). Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**: 897-901.
146. Través, P.G., R. López-Fontal, A. Luque, and S. Hortalano (2011). The tumor suppressor ARF regulates innate immune responses in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **187**: 6527-6538.
147. Través, P.G., A. Luque, and S. Hortalano (2012). Macrophages, inflammation, and tumor suppressors: ARF, a new player in the game. *Mediators of inflammation* **2012**: 568783.
148. Tsubaki, M., C. Kato, M. Manno, M. Ogaki, T. Satou, T. Itoh, T. Kusunoki, Y. Tanimori, K. Fujiwara, H. Matsuoka, and S. Nishida (2007). Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) enhances a receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) expression in mouse bone marrow stromal cells and osteoblasts through MAPK and PI3K/Akt pathways. *Mol Cell Biochem* **304**: 53-60.
149. Ulanet, D.B. and D. Hanahan (2010). Loss of p19Arf facilitates the angiogenic switch and tumor initiation in a multi-stage cancer model via p53-dependent and independent mechanisms. *PLoS ONE* **5**: e12454.
150. van Furth, R. and Z.A. Cohn (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine* **128**: 415-435.
151. Verreck, F.A., T. de Boer, D.M. Langenberg, L. van der Zanden, and T.H. Ottenhoff (2006). Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol* **79**: 285-293.
152. Waheed, A. and R.K. Shadduck (1979). Purification and properties of L cell-derived colony-stimulating factor. *J Lab Clin Med* **94**: 180-193.
153. Wang, H.-W. and J.a. Joyce (2010). Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: Priming for protumoral functions *Cell Cycle* **9**: 4824-4835.

154. Weber, J.D., J.R. Jeffers, J.E. Rehg, D.H. Randle, G. Lozano, M.F. Roussel, C.J. Sherr, and G.P. Zambetti (2000). p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes & development* **14**: 2358-2365.
155. Weisberg, S.P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, and A.W. Ferrante, Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112**: 1796-1808.
156. Welch, J.S., L. Escoubet-Lozach, D.B. Sykes, K. Liddiard, D.R. Greaves, and C.K. Glass (2002). TH2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism. *J Biol Chem* **277**: 42821-42829.
157. Wery-Zennaro, S., J.L. Zugaza, M. Letourneur, J. Bertoglio, and J. Pierre (2000). IL-4 regulation of IL-6 production involves Rac/Cdc42- and p38 MAPK-dependent pathways in keratinocytes. *Oncogene* **19**: 1596-1604.
158. Whyte, C.S., E.T. Bishop, D. Rückerl, S. Gaspar-Pereira, R.N. Barker, J.E. Allen, A.J. Rees, and H.M. Wilson (2011). Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. *Journal of leukocyte biology* **90**: 845-854.
159. Widau, R.C., Y. Zheng, C.Y. Sung, A. Zelivianskaia, L.E. Roach, K.M. Bachmeyer, T. Abramova, A. Desgardin, A. Rosner, J.M. Cunningham, and S.X. Skapek (2012). p19Arf represses platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Molecular and cellular biology* **32**: 4270-4282.
160. Wiechelman, K.J., R.D. Braun, and J.D. Fitzpatrick (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* **175**: 231-237.
161. Wu, R., H. Kausar, P. Johnson, D.E. Montoya-Durango, M. Merchant, and M.J. Rane (2007). Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex. *The Journal of biological chemistry* **282**: 21598-2608.
162. Wu, X., B.C. Schulte, Y. Zhou, D. Haribhai, A.C. Mackinnon, J.A. Plaza, C.B. Williams, and S.T. Hwang (2014). Depletion of M2-like tumor-associated macrophages delays cutaneous T-cell lymphoma development in vivo. *J Invest Dermatol* **134**: 2814-22.
163. Wynn, T.A., A. Chawla, and J.W. Pollard (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**: 445-455.
164. Xirodimas, D.P., J. Chisholm, J.M.S. Desterro, D.P. Lane, and R.T. Hay (2002). P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2. *FEBS letters* **528**: 207-211.

165. Xu, B., A. Bhattacharjee, B. Roy, H.-M. Xu, D. Anthony, D.A. Frank, G.M. Feldman, and M.K. Cathcart (2003). Interleukin-13 induction of 15-lipoxygenase gene expression requires p38 mitogen-activated protein kinase-mediated serine 727 phosphorylation of Stat1 and Stat3. *Molecular and cellular biology* **23**: 3918-3928.
166. Yetil, A., B. Anchang, A.M. Gouw, S.J. Adam, T. Zabuawala, R. Parameswaran, J. van Riggelen, S. Plevritis, and D.W. Felsner (2015). p19ARF is a critical mediator of both cellular senescence and an innate immune response associated with MYC inactivation in mouse model of acute leukemia. *Oncotarget* **6**: 3563-3577.
167. Yonenaga, Y., A. Mori, H. Onodera, S. Yasuda, H. Oe, A. Fujimoto, T. Tachibana, and M. Imamura (2005). Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology* **69**: 159-166.
168. Zeisberger, S.M., B. Odermatt, C. Marty, A.H.M. Zehnder-Fjällman, K. Ballmer-Hofer, and R.A. Schwendener (2006). Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *British journal of cancer* **95**: 272-281.
169. Zerrouqi, A., B. Pyrzynska, M. Febbraio, D.J. Brat, and E.G. Van Meir (2012). P14ARF inhibits human glioblastoma-induced angiogenesis by upregulating the expression of TIMP3. *J Clin Invest* **122**: 1283-1295.
170. Zheng, C., Z. Lin, Z.J. Zhao, Y. Yang, H. Niu, and X. Shen (2006). MAPK-activated protein kinase-2 (MK2)-mediated formation and phosphorylation-regulated dissociation of the signal complex consisting of p38, MK2, Akt, and Hsp27. *The Journal of biological chemistry* **281**: 37215-37226.
171. Zhu, Z., T. Zheng, R.J. Homer, Y.K. Kim, N.Y. Chen, L. Cohn, Q. Hamid, and J.A. Elias (2004). Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* **304**: 1678-1682.
172. Zimnik, S., M. Gaestel, and R. Niedenthal (2009). Mutually exclusive STAT1 modifications identified by Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation. *Nucleic Acids Research* **37**: 1-7.







A black and white microscopic image showing a dense field of sperm cells. Each cell consists of a small, dark, oval head and a long, thin, wavy tail. The cells are scattered across the entire frame, with some appearing more clearly than others. A semi-transparent horizontal band is visible across the middle of the image, serving as a background for the text.

**A**NEXO



## PUBLICACIONES QUE FORMAN PARTE DE LA TESIS DOCTORAL

Critical role of p38 MAPK in IL-4-induced alternative activation of peritoneal macrophages. **Jiménez-García L**, Herranz S, Luque A, Hortelano S. Eur J Immunol. 2015 Jan;45(1):273-286. doi: 10.1002/eji.201444806.

Tumor suppressor ARF regulates tissue microenvironment and tumor growth through modulation of macrophage polarization. **Jiménez-García L**, Herranz S, Higuera MA, Luque A, Hortelano S. (Aceptado en Oncotarget)

Thioglycollate-elicited peritoneal macrophages preparation and arginase activity measurement in IL-4 stimulated macrophages. **Jiménez-García L**, Herranz S, Luque A, Hortelano S. <http://www.bio-protocol.org/e1585>, Vol5, Iss17, Sep 20, 2015.

Chitin-challenged Mice Model to Study M2 Macrophages Polarization. **Jiménez-García L**, Herranz S, Luque A, Hortelano S. <http://www.bio-protocol.org/e1584>, Vol5, Iss17, Sep 20, 2015.

## OTRAS PUBLICACIONES

A hispanolone-derived diterpenoid inhibits M2-Macrophage polarization in vitro via JAK/STAT and attenuates chitin drive allergic inflammation in mice.

**Jimenez-Garcia L**, Herranz S, de Las HB, Luque A, Hortelano S. (Manuscrito en revisión)

8,9-dehydrohispanolone-15,16-lactol diterpene prevents LPS-triggered inflammatory responses by inhibiting endothelial activation. Biochem J. 2016 Jul 15; 473(14):2061-2071 **Jimenez-García L**, G.Través P, Lopez-Frontal R, Herranz S,Higuera M.A, de las HB, Hortelano S, Luque A.

alpha-Hispanolol sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via death receptor up-regulation Mota A\*, **Jimenez-Garcia L\***, Herranz S, de Las HB, Hortelano S. Toxicol Appl.Pharmacol. 2015, 286:168-177. \*these authors contributed equally to this work.